

**Untersuchung einer neuen Methode zur Integration von angebundenen
Doppellipidschichten in CMOS-Strukturen zur Realisierung bioelektrischer
Sensoren**

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften
der Abteilung Elektrotechnik und Informationstechnik
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

genehmigte Dissertation

von

Sarah Kißler, geb. Dierk

aus

Bielefeld

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Vogt
 2. Gutachter: Prof. Dr. Hoc-Khiem Trieu
- Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Biosensorik	6
2.1.1	Doppellipidschichten	9
2.1.2	Ionophore	14
2.1.2.1	Ligandengesteuerte Ionenkanäle	16
2.2	Elektrochemische Impedanzspektroskopie	16
2.2.1	Potentiostat	17
2.2.2	Bestimmung der Impedanz und der Phase	18
2.2.2.1	Bode-Plott	21
2.3	Modellierung der Membran und der Elektrodenoberfläche	22
2.3.1	Die elektrolytische Doppelschicht im Sternmodell	22
2.3.2	Membrantransport	25
2.3.3	Die Spacerkapazität	29
2.3.4	Sorptionsverhalten der Analyten	31
2.4	Stand der Entwicklung	33
2.4.1	Mikroelektroden	33
2.4.2	Detektion von Antikörpern	35
2.4.3	CMOS-Integration verschiedener Messverfahren	36
2.5	Biosensorkonzept der vorliegenden Arbeit	41
3	Untersuchungsansätze und -methoden	44

3.1	Herstellung der Membran	47
3.1.1	Herstellung einer Gold-Elektrode	47
3.1.2	Bildung einer Monolage	48
3.1.3	Makro- und Mikroelektroden	49
3.1.4	Bildung der Doppellipidschicht durch Vesikellösung	52
3.1.5	Integration von Ionophoren	55
3.2	Verifizierung des Sensorprinzips	56
3.2.1	Diskrete Ausleseschaltung	56
3.2.1.1	Messaufbau und Test	57
3.2.2	CMOS-Ausleseschaltung	60
3.2.2.1	Simulation	63
3.2.2.2	Messaufbau und Test	64
3.2.2.3	Ankopplung der Membran an die Sensorschaltung	65
4	Ergebnisse	67
4.1	Herstellung der Membran	67
4.1.1	Rauheit der Goldelektroden	67
4.1.2	Mikroelektroden	68
4.1.3	Von der Monolage zur Doppellipidschicht	69
4.2	Verifizierung des Sensorprinzips	74
4.2.1	Diskrete Ausleseschaltung	74
4.2.1.1	Charakterisierung der Doppellipidschicht mittels EIS	74
4.2.1.2	Sensormessung und Simulation	78
4.2.2	CMOS-Ausleseschaltung	82
4.2.2.1	Simulation	82
4.2.2.2	Modifikation der Ausleseschaltung	85
4.2.2.3	Test der Ausleseschaltung	87
4.2.2.4	Charakterisierung der Membran	89
4.2.2.5	Ankopplung an die Sensorschaltung	91

4.3	Die Valinomycinkonzentration in der Doppellipidschicht	93
5	Fazit und Ausblick	98
6	Zusammenfassung	101

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in den Abteilungen "Integrierte Sensoren und Aktoren" (ISA) und "Technologie, Forschung und Entwicklung" (TFE) am Fraunhofer-Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (IMS) in Duisburg.

Ich möchte mich bei allen bedanken, ohne die die Erstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Anton Grabmaier danke ich für die Möglichkeit zur Promotion am Fraunhofer-Institut.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Vogt danke ich herzlich für die wertvollen Ratschläge für das Gelingen der Arbeit und die Überlassung des Promotions-themas.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Hoc-Khiem Trieu für die Betreuung und Unterstützung während der Promotion und für die Übernahme der Koreferenz.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Ingo Köper für die konstruktive und nette Zusammenarbeit bedanken und für die Möglichkeit, einen Teil meiner Forschung in seinen Laboren durchführen zu können. Zusätzlich gilt mein Dank dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, ohne dessen Unterstützung dieser Auslandsaufenthalt nicht möglich gewesen wäre.

Ein großes Dankeschön geht an Burkhard Klein für die Entwicklung des Simulationsprogrammes und an Dr. Dieter Greifendorf für die Entwicklung der diskreten Ausleseschaltung.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich ganz herzlich für interessante Diskussionen und aufbauende Gespräche bedanken.

Abschließend danke ich meiner gesamten Familie für die bedingungslose Unterstützung während der Promotionsphase.

1. Einleitung

Die immer älter werdende Gesellschaft erfordert ein immer flexibler werdendes Gesundheitssystem. Gerade die Krankheit Krebs spielt mit höherem Alter eine immer größere Rolle, wobei die Voraussetzungen für gute Heilungschancen häufig mit einer frühzeitigen und genauen Diagnose verknüpft sind. Die herkömmlichen Methoden zur Krebsdiagnose sind bildgebende Verfahren, wie die Magnetresonanztomographie (MRT). Da mit dem Verfahren lediglich vergleichsweise große Tumoren nachgewiesen werden können, wäre es wünschenswert, Verfahren zu entwickeln, die den Krebs bereits in einem früheren Entwicklungsstadium diagnostizieren können. Hierbei kommen die sogenannten Tumormarker ins Spiel. Ist eine Person an Krebs erkrankt, so sondert der Tumor spezifische Proteine, die sogenannten Tumormarker, aus, die sich z.B. im Blut, Urin oder Speichel nachweisen lassen.

Ein gängiges Verfahren zur Untersuchung biologischer Substanzen ist die Analyse in einem Labor. Ein Beispiel für so eine Analyse ist das immunologische Nachweisverfahren ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) [1], das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der Nachteil von ELISA ist, dass die Methode sehr aufwändig ist: Um einen Stoff in einer Probe nachzuweisen, muss er zuvor mit einem Marker präpariert werden, die Probe muss zu einem Labor gebracht werden und es ist geschultes Fachpersonal zur Durchführung erforderlich.

Aus dem Bedarf, die aufwändigen Analysen zu umgehen, hat sich das Point-of-Care-Testing (POCT) [2] entwickelt. POCT ist ein Sammelbegriff für Geräte, mit denen Laien ohne eine vorherige Probenpräparation Analysen durchführen können. Das hat unter anderem den Vorteil, dass das Messergebnis zeitnah zur Verfügung steht. Die Funktionsweisen der POCT-Geräte sind vielfältig, was sowohl die Detektion der Analyten als auch die Umsetzung des Signals "Vorhandensein der Analyte" in ein messtechnisch zugängliches Signal betrifft. Hierbei gibt es z.B. optische Verfahren, die auf der Fluoreszenzspektroskopie oder der Oberflächenplasmonenresonanz basieren, massensensitive Verfahren, elektrochemische Verfahren, die eine Reaktion detektieren, bei der ein Stoffumsatz stattfindet, um die wichtigsten zu nennen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Realisierung und Verifizierung eines bislang nicht erprobten Biosensorprinzips mit dem Fernziel, das Prinzip für den Nachweis von Tumormarkern im POCT-Bereich einzusetzen. Das Verfahren nutzt dabei einen kapazitiven Effekt aus. Der Sensor besteht aus einem CMOS-Chip mit einer Ausleseschaltung, einer Elektrode und einer darauf angebundenen biomimetischen Membran, welche die Eigenschaft hat, Valinomycinpeptide zu absorbieren. Bei Absorption der Peptide ändert sich die Kapazität des Bereiches zwischen Membran und Elektrode. Der Vorteil des Messprinzips gegenüber optischen Verfahren ist die Möglichkeit ein Messergebnis zu erhalten, das über ein Ja/Nein-Ergebnis hinaus geht. Nach entsprechender Kalibration kann die Konzentration des Analyten in der Messlösung bestimmt werden. Ein Vorteil, insbesondere gegenüber der Fluoreszenzspektroskopie, ist, dass die Markierung der Analyten mit einem Farbstoff wegfällt. Zudem ist das Messergebnis direkt ablesbar. Bei vielen Verfahren wird das Ergebnis aus einer aufwändigen Datenanalyse extrahiert. Da das Messprinzip CMOS-basiert ist, ergeben sich weitere Vorteile. Es wird eine kostengünstige Miniaturisierung und zudem eine Arrayfähigkeit ermöglicht. Die Schaltung kann so modifiziert werden, dass während einer Messung mehrere Elektroden gleichzeitig ausgelesen werden. Dadurch können in einer Probe gleichzeitig verschiedene Analyten nachgewiesen werden oder es kann über die Ergebnisse der einzelnen Pixel gemittelt werden, was die Genauig-

keit erhöht. Mit integrierter Sensorsignalverarbeitung bietet der Sensor eine vielversprechende Basis zur Realisierung miniaturisierter Diagnostiksysteme.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Biosensorik

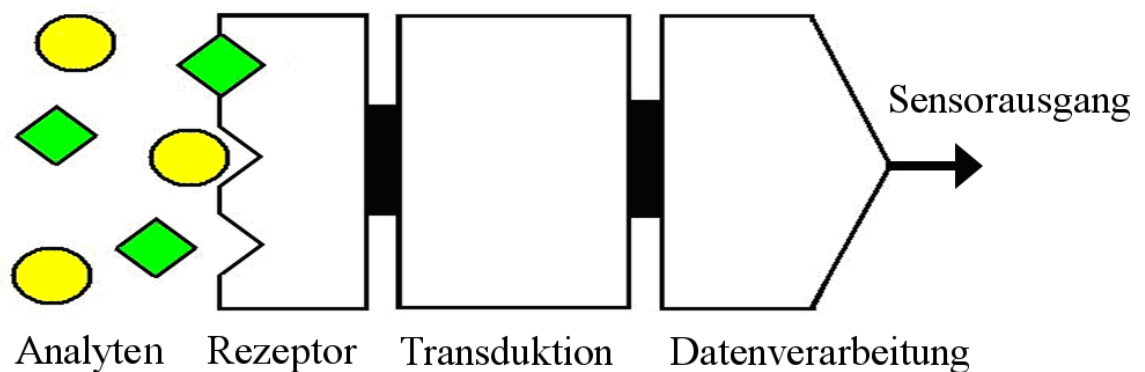


Abbildung 2.1: Allgemeiner Aufbau eines Biosensors

Ein Biosensor (vgl. Abbildung 2.1) ist ein analytisches Gerät, welches die Kombination zweier Elemente nutzt: Eine biologische Komponente, den Biorezeptor [3], welcher den zu detektierenden Stoff erkennt und ein damit verbundenes weiteres Element, den Transduktor, der das Erkennungsereignis in ein auswertbares Signal umwandelt. Meistens wird das Signal anschließend weiterverarbeitet, beispielsweise

Analyten	Rezeptoren
Glukose	Enzym Glukoseoxidase
Harnstoff	Enzym Urease
Antigen	Antikörper
Hormon	Rezeptoren von membranständigen Proteinen z.B. Ligandengesteuerte Ionenkanäle (vgl. Abschnitt 2.1.2.1)

Tabelle 2.1: Beispiele für Analyten und die dazugehörigen Rezeptoren

verstärkt [4].

Der Biorezeptor hat die Aufgabe einen bestimmten Analyten selektiv und empfindlich nachzuweisen. Dies geschieht durch eine hoch spezifische Bindung zwischen dem nachzuweisenden Analyten und dem Biorezeptor [5]. Einige Beispiele sind in Tabelle 2.1 [6][7] aufgeführt. Die spezifische Bindung zwischen einem Antigen und einem Antikörper, aber auch zwischen einem Hormon und einem Rezeptor funktioniert dabei nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip (vgl. Abbildung 2.2). Hierbei findet eine Bindung nur statt, wenn die Bindungspartner geometrisch vom Aufbau zueinander passen [8].

Der Transduktor wandelt diese Information (das Andocken) in ein Signal um, wel-

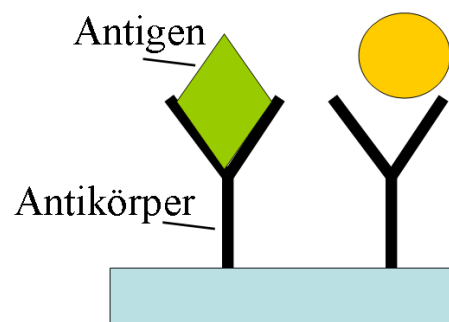


Abbildung 2.2: Schlüssel-Schloss-Prinzip

ches messtechnisch zugänglich ist. Hierbei gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Prinzipien, die durch die folgenden Methoden klassifiziert werden können: massen-

sensitiv, thermisch, optisch, magnetisch, elektrochemisch [9][10][11] und kapazitiv, wobei letzteres im Messprinzip der vorliegenden Arbeit angewandt wird.

Nach der Umwandlung wird das Signal von einer Ausleseschaltung verstärkt und verarbeitet, so dass dem Anwender ein Messwert vorliegt, der interpretiert werden kann [12][13]. In den meisten Fällen ist das Signal ein Maß für die Konzentration des Analyten (vgl. Abschnitt 2.3.4).

Am Beispiel des Nachweises von Glucose (z.B. im Einsatz in Glucosemessgeräten für Diabetiker) soll nun gezeigt werden, wie vielfältig die Möglichkeiten der Nachweisprinzipien von Biosensoren sind. Die in Abbildung 2.3 gezeigten Messprinzipien basieren auf dem Enzym Glukose-Oxidase. Der Sauerstoff, der bei der Reaktion

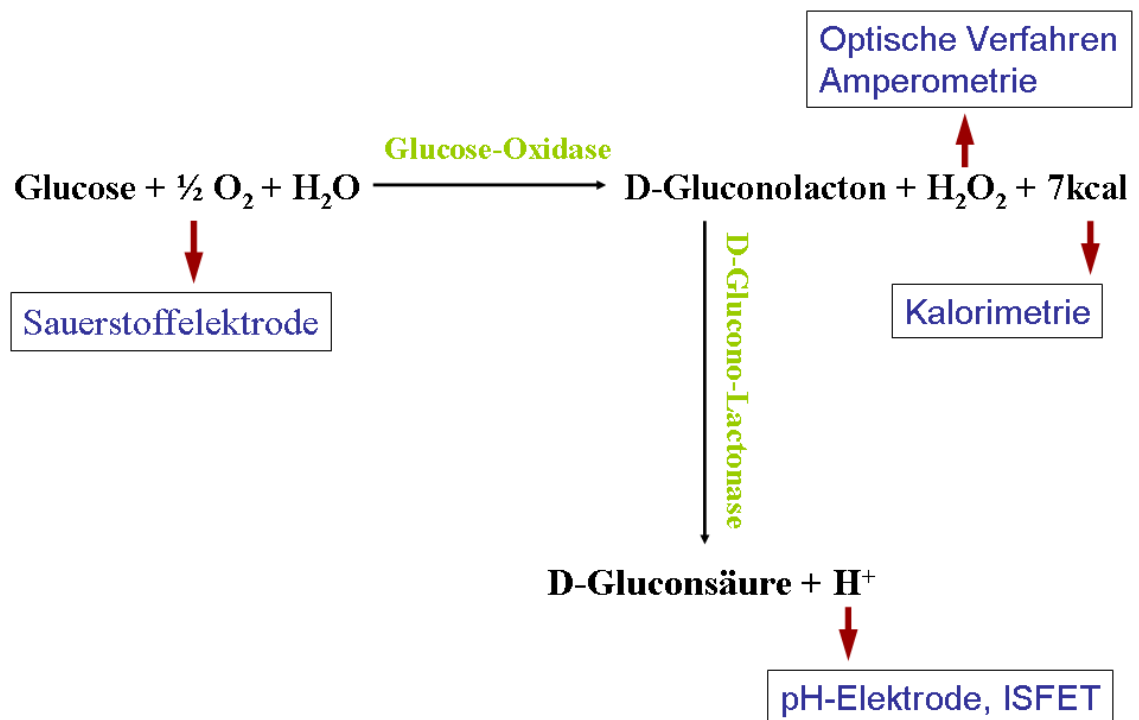


Abbildung 2.3: Bestimmung der Glucosekonzentration mit Hilfe des Enzyms Glucose-Oxidase - verschiedene Nachweisprinzipien

von Glucose mit Glucose-Oxidase verbraucht wird, kann mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode gemessen werden. Für die Messanordnung wird häufig eine Silber/Silber-

Chlorid-Elektrode als Referenzelektrode und eine Platinelektrode als Arbeitselektrode (vgl. Abschnitt 2.2.1) verwendet. Wird ein für den Sauerstoff spezifisches Potential eingestellt, so ist der gemessene Strom ein Maß für die Menge des Sauerstoff, die bei der Reaktion verbraucht wird und somit auch für die Glukose-Konzentration. Weiterhin entsteht bei der Reaktion Wasserstoffperoxid, welches mit optischen [14] und auch amperometrischen [15] Verfahren gemessen werden kann. Außerdem wird bei der Reaktion Wärme umgesetzt, welche mit einem Kalorimeter bestimmt werden kann.

In einer anschließenden Reaktion kann das D-Gluconolakton zu Gluconsäure reagieren, wobei H^+ freigesetzt wird. Dies lässt sich mit einer pH-Elektrode oder auch mit ionensensitiven Feldeffekttransistoren (ISFET) nachweisen. [7]

2.1.1 Doppellipidschichten

Lipide sind eine Stoffgruppe, die als gemeinsame Eigenschaft die Unlöslichkeit in Wasser besitzen [16]. Lipide, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil bestehen, heißen amphiphil und werden auch membranbildende Lipide genannt. Ein Beispiel hierfür sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Phospholipide (vgl. Abbildung 2.4)

Aufgrund der amphiphilen Struktur ordnen sich die Lipide in wässrigen Lösungen

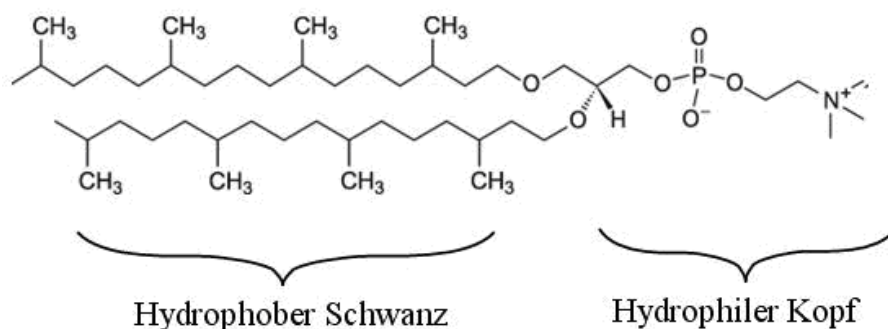


Abbildung 2.4: Strukturformel des Phospholipids DPhyPC der Firma Avanti Polar Lipids [17].

derart an, dass der hydrophobe Teil nach innen und der hydrophile nach außen weist [18]. Wird eine Lipidlösung in eine wässrige Lösung gegeben, so bilden sich z.B. Mizellen (vgl. Abbildung 2.5) oder Vesikel (vgl. Abbildung 2.6). Mizellen bestehen dabei aus einer Lipidschicht, während Vesikel aus einer Doppellipidschicht bestehen. Hierbei verhindert das hydrophobe Innere die Diffusion der Ionen durch die Doppellipidschicht hindurch, da in der Flüssigkeit befindliche Ionen von einer Hydrathülle umgeben sind [19]. Die Doppellipidschicht funktioniert daher als Membran.

Um Doppellipidschichten für die Biosensorik einzusetzen, müssen sie in ein System integriert werden, welches einen messtechnischen Zugang ermöglicht. Ein Ansatz hierfür ist die Aufspannung der Membran über einer Öffnung von wenigen Mikrometern, die so genannte "Black Lipid Membrane Technique" [20] (vgl. Abb. 2.7). Auf beiden Seiten der Folie entsteht eine Monolage aus Lipiden, die die Öffnung überspannen. So entsteht an dieser Stelle eine Doppellipidschicht, die einen sehr hohen Widerstand im Giga-Ohm-Bereich besitzt [21]. Da die Membranen für sichtbares Licht nicht durchlässig sind, werden sie auch schwarze Doppellipidschichten (Black Lipid Membranes) genannt.

Jedoch haben die schwarzen Lipid-Membranen eine extrem labile Struktur und

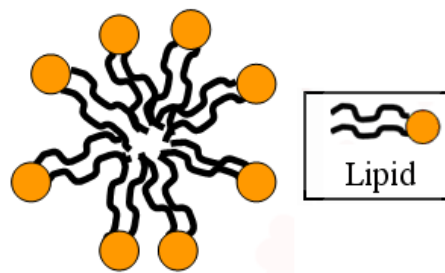


Abbildung 2.5: Querschnitt einer Mizelle

sind daher nur über einen kurzen Zeitraum von wenigen Stunden stabil. Damit sind sie nur begrenzt für Biosensor-Anwendungen geeignet. Eine Verbesserung der Langzeitstabilität der Membran wird durch die direkte Anbindung an eine Oberfläche erreicht (vergleiche Abbildung 2.8). Allerdings befindet sich bei Membranen, die di-

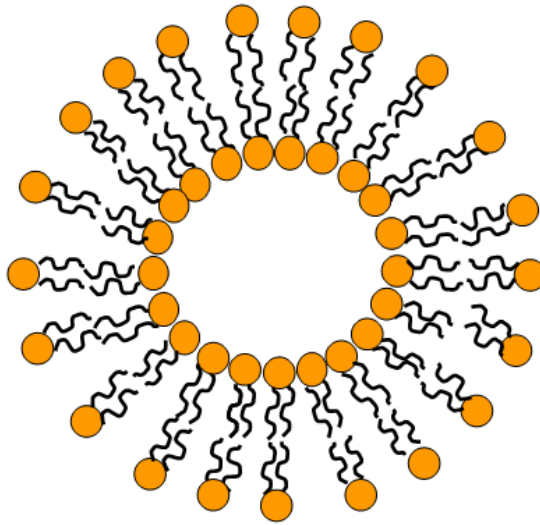


Abbildung 2.6: Querschnitt eines Vesikels

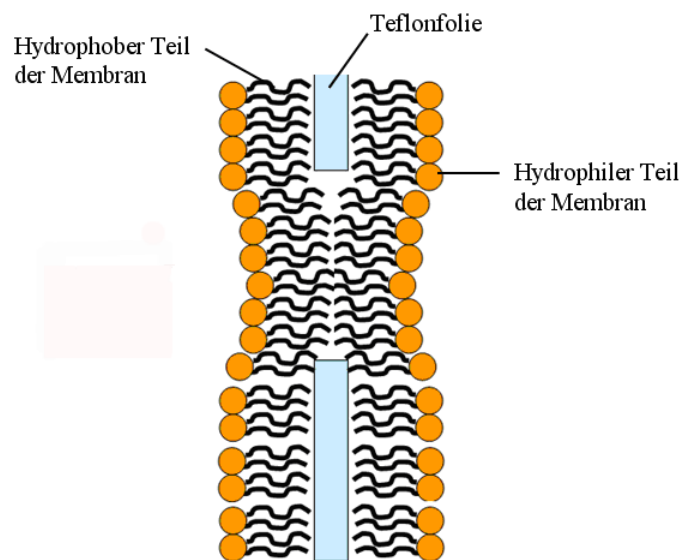


Abbildung 2.7: Querschnitt einer schwarzen Doppellipidschicht, gespannt über einer Teflon-Folie.

rekt an einer Oberfläche befestigt sind (sBLM: supported Bilayer Lipid Membranes), nur wenig Platz (ca. 1 nm) zwischen Membran und Substrat. Da es für Biosensoranwendungen interessant ist, Proteine in Membranen einzubauen und da die Proteine über den Bereich der Membran herausragen, ergibt sich bei sBLMs eine Wechselwirkung zwischen Substrat und den eingebauten Proteinen. Diese können durch die Wechselwirkung denaturieren [22].

Eine Lösung des Problems liegt darin, den Abstand zwischen Membran und Sub-

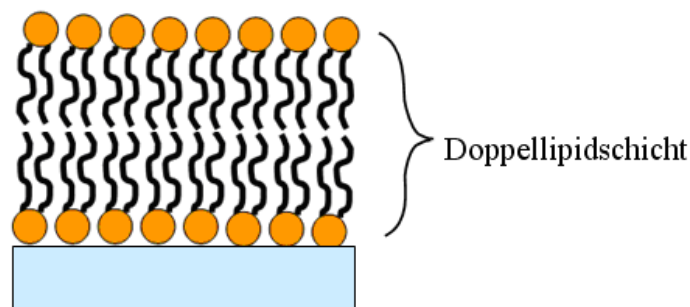


Abbildung 2.8: Unterstützte Doppellipidschicht mit direkter Anbindung an die Elektrodenoberfläche(sBLMs).

strat durch eine weitere Molekülkette, dem Spacer, zu vergrößern. Damit wird die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung (z.B. Diffusion von Atomen der Oberfläche) zwischen Proteinen und Elektrodenoberfläche minimiert. Dies sind die so genannten "tethered Bilayer Lipid Membranes" (tBLMs). Eine schematische Darstellung der Struktur einer tBLM ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

Diese bieten die Möglichkeit, Proteine langzeitstabil über mehrere Monate hinweg einzubauen [22]. Zusätzlich wurde auch für tBLMs bereits gezeigt, dass es möglich ist, hohe elektrische Widerstände im Gigaohm-Bereich [23] zu erreichen. Aufgrund der Kombination der Vorteile, der Möglichkeit Proteine langzeitstabil einzubauen und den hohen elektrischen Widerständen wurden tBLMs für die hier geplante Biosensor-Anwendung ausgewählt.

In dieser Arbeit werden tBLMs mit zwei verschiedenen Molekülen mit Spacern

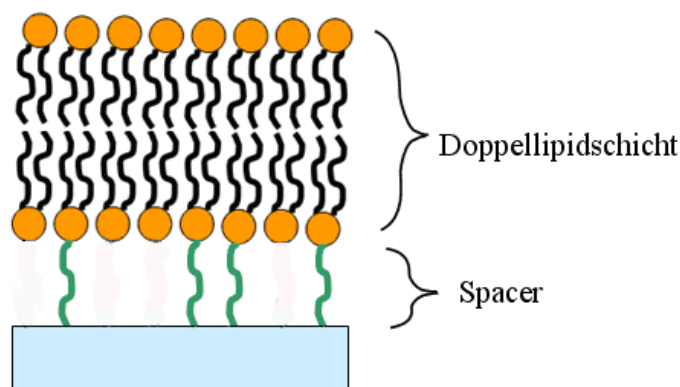


Abbildung 2.9: Angebundene Doppellipidschicht (tBLMs).

(DPTL¹, DPHT²) verwendet, die von der Arbeitsgruppe am MPIP in Mainz von Dr. Ingo Köper (jetzt: Flinders University Adelaide) synthetisiert wurden.

Die Molekülstrukturen sind in den Abbildungen 2.10 und 2.11 dargestellt. Sie unterscheiden sich sowohl in der Länge als auch in der Zahl und Art der Bindungsstellen. DPTL besitzt eine Spacer-Länge von 5 nm und als Anker einen Liponsäurerest mit der Möglichkeit für zwei kovalente Bindungen mit dem Substrat. Der Spacer von DPHT hat eine Länge von 5,2 nm und als Anker eine Thiolgruppe. Die Unterschiede führen einerseits zu verschiedenen Ionenreservoir-Ausdehnungen und andererseits zu verschieden dicht gepackten Spacerregionen. [24]

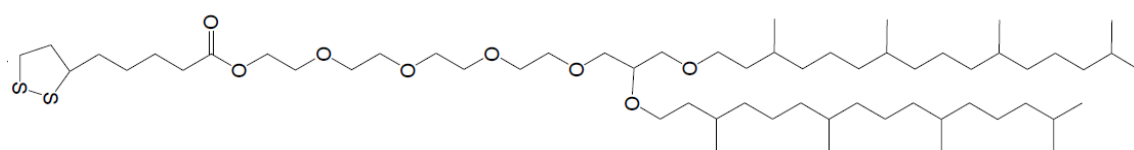


Abbildung 2.10: Strukturformel von DPTL [25]

¹DPHT di-phytanyl-glycerol-hexaethylene glycol-mercaptopropyl ether lipid

²DPTL di-phytanyl-glycerol-tetraethylene glycol-lipoic acid ester lipid

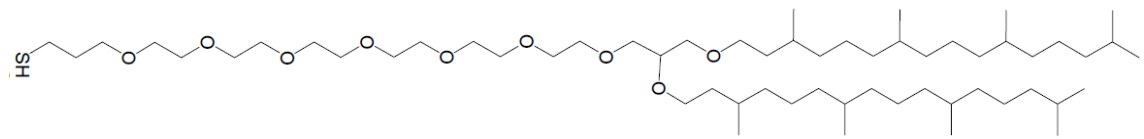


Abbildung 2.11: Strukturformel von DPHT [25]

2.1.2 Ionophore

Ionophore sind eine Gruppe von Proteinen, die in Doppellipidschichten eingebaut werden können und es Ionen ermöglichen, Doppellipidschichten zu durchqueren.

Ionophore können Ionenkanäle oder Transporter (engl.: Carrier) sein. Für die vorliegende Arbeit sind hierbei der verwendete Ionencarrier Valinomycin 2.12 und der Ionenkanal α -Hämolysin 2.13 von Bedeutung. Ionophore sind nur für bestimmte Ionen durchlässig. Valinomycin und α -Hämolysin sind selektiv für Kalium-Ionen. Um das Ionophor zu passieren, muss das Ion seine Hydrathülle abstreifen. Die Hydratisierungsenergien liegen im Bereich von kovalenten Bindungen, sind also sehr hoch. Gibt es für eine Ionenart energetisch günstige Bindungsstellen innerhalb des Ionophors, die im Bereich der Hydratisierungsenergien liegen, streift das Ion seine Hydrathülle ab und diffundiert in das Ionophor [26]. Liegen die Bindungsstellen zu weit (Entfernungen im Nanometer-Bereich) weg, wäre also eine Bindung energetisch ungünstiger, so passiert es die Membran nicht.

Der Fluss der Ionen erfolgt hierbei entlang eines elektrochemischen Gradienten durch Diffusion. Um eine hohe Durchflussgeschwindigkeit zu erreichen, darf bei Ionenkanälen die Verweildauer der Ionen im Inneren des Kanals nicht zu hoch sein, also die Bindung innerhalb des Kanals nicht zu stark. Der Ablösevorgang des Ions und das Verlassen des Kanals wird durch das nachfolgende Ion hervorgerufen (Diffusion).

Ionenkanäle sind meist aus einigen Untereinheiten, welche aus Molekülen bestehen, aufgebaut, die einen schlauchförmigen Kanal bilden, der die Membran vollständig senkrecht zur Ebene durchdringt. Für das jeweilige Ionophor spezifische Ionen kön-

nen dann durch diesen Kanal diffundieren.

Ionentransporter binden ein bestimmtes Ion, diffundieren damit durch die Membran

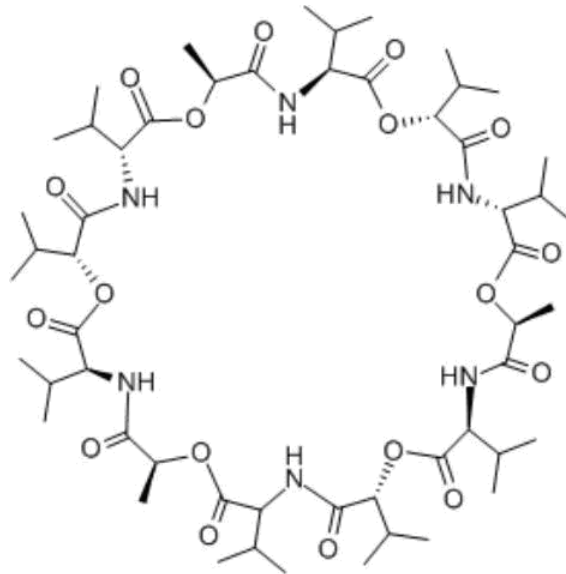


Abbildung 2.12: Strukturformel Valinomycin [27]

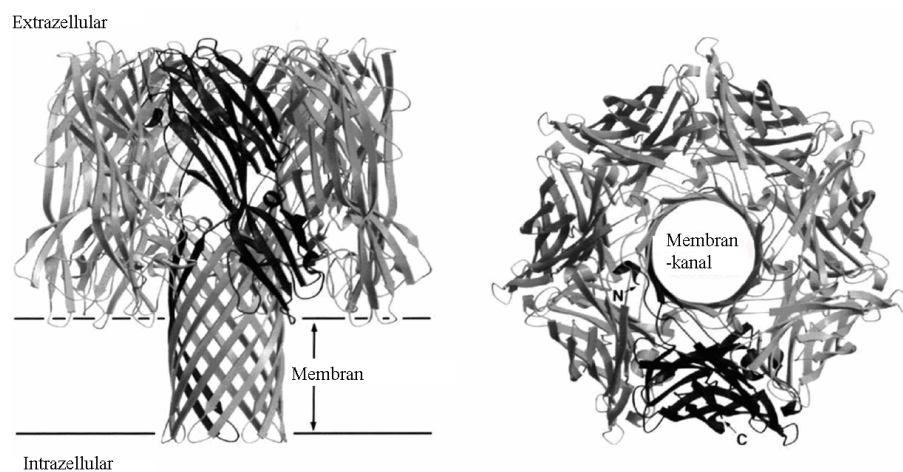


Abbildung 2.13: Kristallstruktur von α -Hämolysin [28]

und geben es auf der anderen Seite wieder frei. Das Valinomycin ist ein Peptid, das zu den Antibiotika gehört. Es ist außen hydrophob. Dadurch kann es nicht in Wasser gelöst werden, ist aber im hydrophoben Inneren der Membran löslich. Dadurch

lässt es sich ohne großen Aufwand in Doppellipidschichten einbauen. Das Valinomycin trennt die Hydratbindungen des Kalium-Ions und bildet beim Falten um das Ion herum neue Bindungen. Transporter besitzen ebenfalls hohe Durchflussschwindigkeiten. Valinomycin transportiert selektiv Kalium-Ionen mit 10000 Ionen pro Sekunde entlang eines Konzentrationsgradienten [29].

2.1.2.1 Ligandengesteuerte Ionenkanäle

Liganden-gesteuerte Ionenkanäle gehören zu den steuerbaren Ionenkanälen. Sie benötigen, im Gegensatz zu nicht gesteuerten Ionenkanälen, einen Impuls, um geöffnet bzw. geschlossen zu werden. Dieser Impuls wird bei Liganden-gesteuerten Kanälen durch den für den jeweiligen Kanal spezifischen Liganden gegeben. Dockt ein Ligand an die spezifische Bindungsstelle (Rezeptor) des Kanals an, so ändert er damit die räumliche Anordnung der Moleküle des Ionenkanals, woraufhin sich eine Pore öffnet, die für bestimmte Ionen durchlässig ist.

Der Ionenstrom ist damit ein Zeichen für eine geöffnete Pore und gleichzeitig für die Anwesenheit des Liganden in der Messlösung. Bei den meisten ligandengesteuerten Ionenkanälen ist das Andocken der Liganden reversibel, die Bindung der Liganden dauert nur einen Bruchteil einer Sekunde. Nach kurzer Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption der Liganden ein. Daher ist in diesem Fall die Anzahl der gebundenen Liganden ein Maß für die Konzentrationen der Liganden in der Messlösung.

2.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Bei der Untersuchung von Doppellipidschichten spielen die Ladungsträgergenerierung, -Trennung und der Ladungstransport durch die Membran eine besondere Rolle. Da diese Prozesse durch die Grenzflächen der Membran bestimmt sind, können sie gut durch elektrochemische Messmethoden untersucht werden. Denn diese beschäftigen sich mit elektrochemischen Phänomenen an und durch Grenzflächen [30].

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Untersuchung elektrochemischer Vorgänge in Flüssigkeiten ist die Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS). In der Biologie ermöglicht sie z.B. die Untersuchung des strukturellen Aufbaus von Doppellipidschichten. Weiterhin geben die Messungen Aufschluss über die Funktion von Ionophoren, welche in die Doppellipidschichten eingebaut sind. Dies ist unter anderem interessant, um die Funktionsweise der Ionophore in unserem Körper besser zu verstehen. So kann z.B. direkt die Wirkung eines Medikaments auf die Ionophore getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die EIS als Referenz zum neu entwickelten Messprinzip verwendet. Für einen entsprechenden Messaufbau wird ein Potentiostat eingesetzt, der an einen Frequenzgang-Analysator (FRA³) gekoppelt ist. Die Kombination der beiden Elemente ermöglicht eine hohe Genauigkeit der Messergebnisse.

2.2.1 Potentiostat

Der Potentiostat wird dazu verwendet, die Impedanz der Membran durch gleichzeitige Messung von Strom und Spannung zu bestimmen.

In der EIS wird, wie bei nahezu allen elektrochemischen Messverfahren, die Drei-Elektroden-Methode mit Arbeitselektrode, Gegenelektrode und Referenzelektrode angewandt. Es werden drei statt zwei Elektroden verwendet, sobald in einem elektrochemischen System ein nicht zu vernachlässigender Strom fließt. Häufig finden an den Elektroden Reaktionen statt, die einen Stromfluss zur Folge haben und die angelegte Spannung beeinflussen.

Bei der Drei-Elektroden-Methode wird die Aufgabe der Gegenelektrode der Zwei-Elektrodenanordnung auf zwei Elektroden verteilt: Zur eigentlichen Gegenelektrode fließt der Strom und die Referenzelektrode misst das Potential stromlos.

Die Regelung des Potentials geschieht mit Hilfe eines Potentiostaten. Ein einfacher Aufbau eines Potentiostaten ist in Abbildung 2.14 dargestellt. Hierbei ist die Referenzelektrode "REF" mit dem invertierenden Eingang eines Operationsverstärkers

³englisch: Frequency response analyser

verbunden, die Gegenelektrode "CE" mit dem Ausgang, und die Arbeitselektrode "WE" ist mit dem nicht-invertierenden Eingang und der Masse verbunden.

Weiterhin wird der resultierende Strom gemessen. Es ist z.B. möglich die Span-

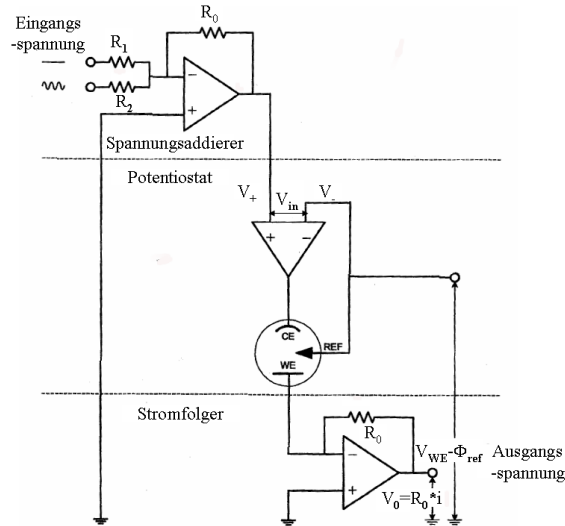


Abbildung 2.14: Schaltbild eines Potentiostaten [31].

nung über einem bekannten, niederohmigen Widerstand abzugreifen, der zwischen Ausgang und Gegenelektrode in Reihe geschaltet ist. Eine Erweiterung besteht darin, zwischen Arbeitselektrode und Masse einen weiteren Operationsverstärker als Stromfolger zu schalten.

Vervollständigt wird der Potentiostat durch einen Spannungsaddierer [31], der eine Eingangsspannung zur Anregung des zu untersuchenden Systems bereitstellt.

Aus den gemessenen Werten des Strom und der Spannung kann anschließend die Impedanz ermittelt werden.

2.2.2 Bestimmung der Impedanz und der Phase

Die Bestimmung der Impedanz und der Phase geschieht in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines FRAs (Frequency Response Analyzer). Hierfür wird das auszulesende Sensorelement mit einer kleinen sinusförmigen Wechselspannung einer bestimmten Frequenz angeregt. Die Impedanz des Systems bei dieser Frequenz wird mit Hilfe

der gemessenen Ausgangsspannung und des fließenden Stromes berechnet. Dies wird bei mehreren Frequenzen im relevanten Frequenzbereich wiederholt, so dass sich ein Spektrum ergibt. Die FRA ermöglicht durch Mittelwertbildung über mehrere Zyklen eine geeignete Rauschunterdrückung [32].

Da das Abtasten hoher Frequenzen eine hohe Abtastrate erfordert, wird bei den meisten erwerblichen Geräten bei Frequenzen über 10 kHz das sogenannte sub-harmonic sampling angewendet (vgl. Abbildung 2.15). Hierbei werden die gemessenen Strom- und Spannungskurven über mehrere Zyklen unterabgetastet. Die Unterabtastrate beträgt $1/n$, wobei n eine ganze Zahl ist. Das unterabgetastete Signal hat dann immer noch die gleiche Amplitude wie das Signal und auch die Phasendifferenz zwischen Spannung und Strom bleibt erhalten. [33]

Die Strom- und die Spannungskurven werden vom Zeitbereich mit Hilfe der diskreten

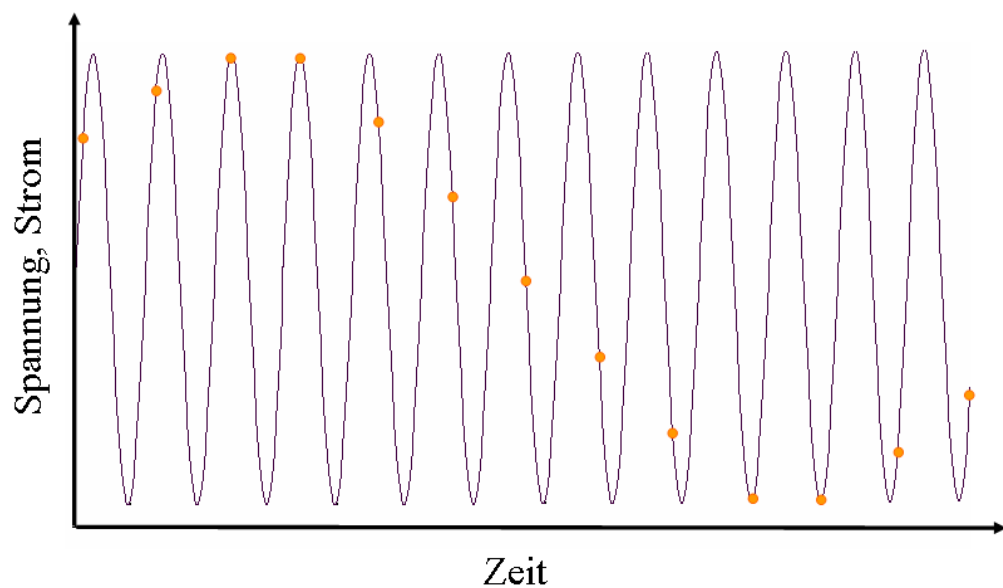


Abbildung 2.15: Prinzip des "sub-harmonic samplings": Die durchgehende Kurve stellt das AC-Signal der Probe dar. Die Punkte stellen das AC Signal nach dem Abtasten dar.

Fouriertransformation in den Frequenzbereich transformiert. Für die Fouriertrans-

formierte der Spannung ergibt sich hierbei

$$\hat{V}_m = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} V(t_k) \exp(-j2\pi m \frac{k}{N}) \quad (2.1)$$

$$= \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} V(t_k) (\cos 2\pi m \frac{k}{N} - j \cdot \sin \cdot 2\pi m \frac{k}{N}). \quad (2.2)$$

Dabei gilt $m=1$ für die fundamentale Komponente und N ist die Anzahl der Abtastpunkte.

Für die Fouriertransformierte des Stromes ergibt sich entsprechend

$$\hat{I}_m = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} I(t_k) \exp(-j2\pi m \frac{k}{N} + \Phi) \quad (2.3)$$

$$= \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} I(t_k) (\cos(2\pi m \frac{k}{N} + \Phi) - j \cdot \sin(2\pi m \frac{k}{N} + \Phi)). \quad (2.4)$$

Hierbei ist Φ die Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom.

Die Impedanz Z wird schließlich über

$$Z = \frac{\hat{V}}{\hat{I}} \quad (2.5)$$

bestimmt.

Zusätzlich werden auf Z einige Korrekturen angewendet. Durch die Signalaufbereitung (z.B. den Einsatz von Verstärkern) entstehen zum Teil Zeitdifferenzen zwischen den Strom und Spannungskurven. Da diese Fehler reproduzierbar sind, können sie berechnet werden. [33]

Der Nachteil der Methode liegt in Dauer der Messungen bei niedrigen Frequenzen. So dauert die Messung zumindest so lange wie ein Zyklus des Schwingungsverlaufes.

Für eine Messung bei 1 mHz werden beispielsweise 1000 s benötigt. Ist es nötig, bei

vielen geringen Frequenzen zu messen, wird das System mit einem Puls, bestehend aus mehreren Frequenzkomponenten, z.B. einer Überlagerung von Sinusfrequenzen, angeregt [34]. So können die Strom- und Spannungskurven des Systems bei mehreren Frequenzen gleichzeitig aufgenommen werden. Daher ist diese Methode sehr zeitsparend, allerdings nicht so genau wie die Einzel-Frequenz-Methode.

Um Nichtlinearitäten und damit höhere Harmonische zu vermeiden, wird die Amplitude der Wechselspannung möglichst gering gewählt.

2.2.2.1 Bode-Plott

In der vorliegenden Arbeit werden die aus der EIS erhaltenen Messdaten im Bode-Diagramm (vgl. Abbildung 2.16) dargestellt. Hierbei sind der Phasenwinkel linear und der Betrag der Impedanz logarithmisch über der Frequenz aufgetragen. Die Frequenz wird ebenfalls logarithmisch dargestellt. Die logarithmische Auftragung ermöglicht eine Übersicht über einen großen Frequenzbereich. Durch eine Analyse der Graphen durch Anpassung einer theoretischen Kurve an die Messdaten können die Werte für die einzelnen Komponenten im Ersatzschaltbild (vgl. Abbildung 2.21) bestimmt werden. Ein idealer Kondensator zeigt sich z.B. im Impedanz-Graphen des Bode-Diagramms in einer Geraden mit einer 45° Steigung und im Phasen-Graphen an einem Winkel von -90° . Ein idealer Widerstand stellt im Impedanz-Graphen eine horizontale Gerade dar und hat im Phasen-Graphen ein Winkel von 0° .

Ein Beispiel für ein elektrochemisches Impedanzspektrum einer Doppellipidschicht ist in Abbildung 2.16 dargestellt. Der Widerstand R_E dominiert im Bereich hoher Frequenzen.

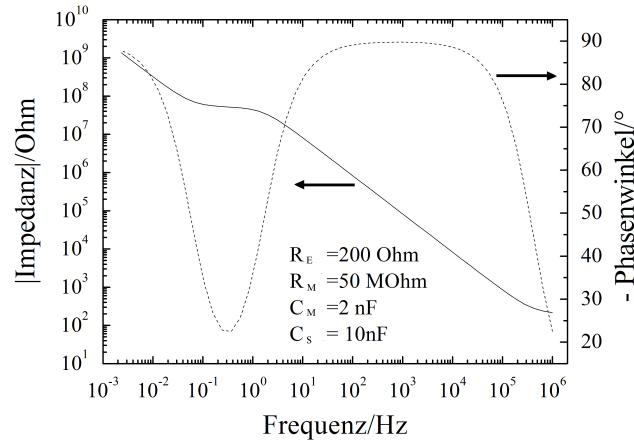


Abbildung 2.16: Mit dem Programm ZVIEW simulierter Bode-Plot einer tBLM. Der Betrag der Impedanz ist auf der linken y-Achse und durch die durchgezogene Linie dargestellt und der Phasenwinkel auf der rechten y-Achse und durch die gestrichelte Linie. Zur Vereinfachung ist der negative Phasenwinkel aufgetragen.

2.3 Modellierung der Membran und der Elektrodenoberfläche

2.3.1 Die elektrolytische Doppelschicht im Sternmodell

Beim Eintauchen einer leitfähigen Elektrode in eine Elektrolytlösung gleicht sich das Fermi-niveau der Elektrode an das elektrochemische Potential des Elektrolyten an. Bei diesem Prozess werden Ionen an der Elektrodenoberfläche adsorbiert, welche entgegengesetzt geladene Ladungsträger aus der Elektrode anziehen, wodurch sich an der Grenzfläche die so genannte Elektrolytische Doppelschicht ausbildet [35]. Der Potentialverlauf von der Elektrode bis zur Elektrolytlösung ist in Abbildung 2.17 dargestellt.

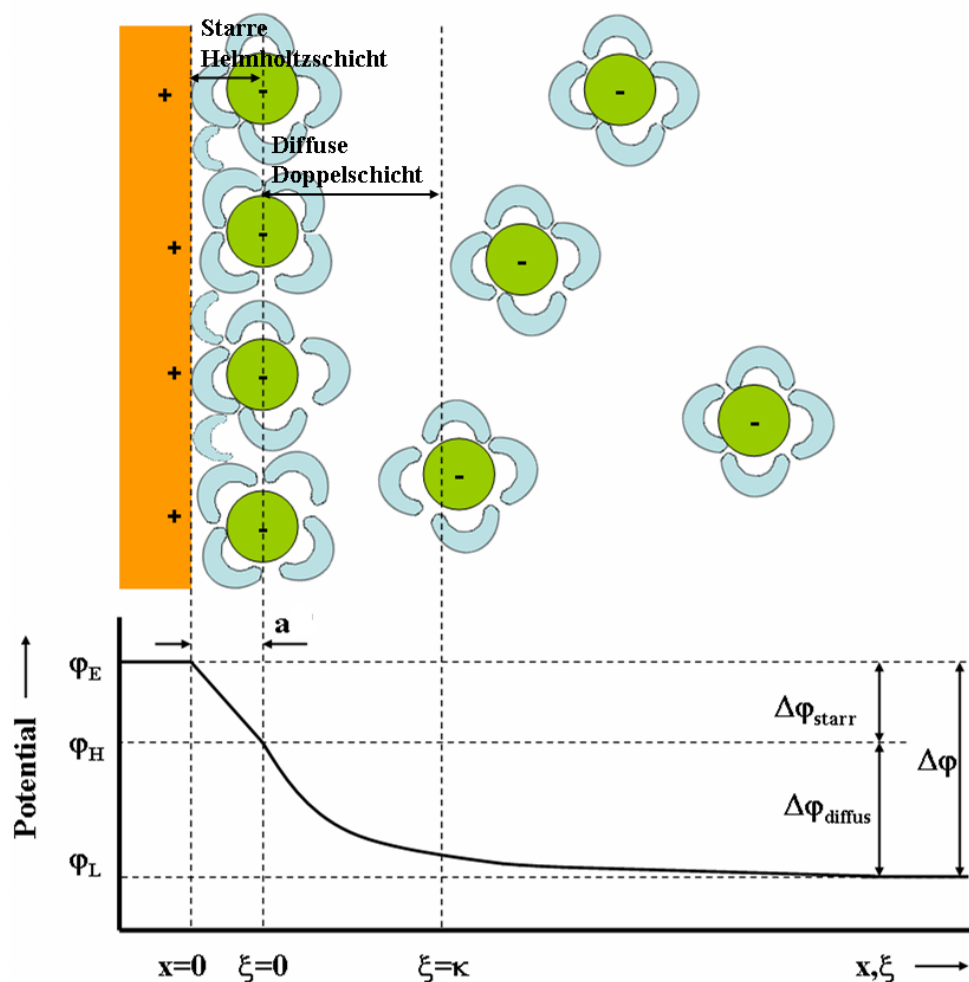


Abbildung 2.17: Potentialverlauf durch die elektrolytische Doppelschicht, die in die starre Helmholtzschicht und die diffuse Doppelschicht aufgeteilt ist. Hierbei ist φ_L das Potential der Lösung, φ_H das Potential am Rand der starren Helmholtzschicht, φ_E das Potential der Elektrolytlösung, x der Abstand von der Elektrodenoberfläche und ξ der Abstand vom Ladungsschwerpunkt der adsorbierten Moleküle.

Da die Ionen auf der Elektrodenoberfläche adsorbiert sind, bilden sie an der Elektrode eine starre Schicht, die so genannte starre Helmholtzschicht. Die Begrenzung der Helmholtzschicht ist durch den Ladungsschwerpunkt der adsorbierten Moleküle a gegeben. Innerhalb der starren Helmholtzschicht fällt das Potential linear ab. Dies kann aus der eindimensionalen Poissonschen Gleichung hergeleitet werden, wenn die Ladungsträger als punktförmig betrachtet werden [35]. In diesem Fall ist der Raum zwischen der Begrenzung der starren Helmholtzschicht und der Elektrodenoberfläche ladungsfrei (Ladungsdichte $\varrho = 0$) und aus

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -\frac{4\pi\varrho}{\epsilon} \quad (2.6)$$

wird

$$\frac{d\varphi}{dx} = \text{const.} \quad (2.7)$$

Hierbei ist φ das Potential, x der Abstand von der Elektrode und ϵ die Permittivität.

Angrenzend an diesen Bereich schließt sich die diffuse Doppelschicht an. Da die starre Helmholtzschicht einen Teil des elektrischen Feldes abschirmt, ist dieses hier schwächer und die thermische Bewegung der Ionen führt dazu, dass die Ionenkonzentration in diesem Gebiet geringer ist als in der starren Helmholtzschicht. Für die Bestimmung des Potentialverlaufs in diesem Bereich kann die Boltzmann-Verteilung angesetzt werden. Hiermit fällt das Potential φ_H exponentiell auf das Potential der Lösung φ_L ab. Bei $\xi = \kappa$ ist das Potential auf $1/e$ von $\Delta\varphi$ abgefallen, wobei κ als die Dicke der diffusen Doppelschicht betrachtet werden kann. κ wird auch Debye-Länge genannt und ist abhängig von der Ionenkonzentration der Lösung [35]. Es gilt

$$\kappa = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r T}{2N_a e^2 I}}, \quad (2.8)$$

mit ϵ_0 Dielektrizitätskonstante, ϵ_r Permittivitätszahl, T Temperatur, N_a Avogadrokonstante, e Elementarladung, $I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i$ die Ionenstärke, z_i Ladungszahl der Ionensorte i und c_i Konzentration der Ionensorte i .

Durch die Ladungstrennung an der Grenzfläche zwischen Elektrolyt und Elektrodenoberfläche entsteht die Elektrolytische Doppelschichtkapazität C_S , welche aus der Kapazität für die starre Helmholtzschicht C_H und der Kapazität für die diffuse Doppelschicht C_D besteht. C_H ist dabei seriell zu C_D geschaltet.

2.3.2 Membrantransport

Das erste Modell für eine Doppellipidschicht wurde in den 1920ern aufgestellt [36]. Zu dieser Zeit untersuchte H. Fricke die Dicke von Doppellipidschichten. Er verwendete hierzu einen Messaufbau mit einer Wheatstone-Brücke. Aus dem Impedanzspektrum schloss er, dass das Ersatzschaltbild einer Doppellipidschicht aus einer Parallelschaltung aus einem Widerstand R_M und einem Kondensator C_M besteht (vgl. Abbildung 2.18). Für eine planare Doppellipidschicht mit der Dicke d_M und der Fläche A kann die Kapazität mit der Formel für einen Plattenkondensator berechnet werden:

$$C_M = \frac{\epsilon_0 \epsilon_{r,M} A}{d_M} \quad (2.9)$$

Hierbei ist ϵ_0 die elektrische Feldkonstante und $\epsilon_{r,M}$ die Permittivitätszahl der Doppellipidschicht (3-10 laut Fricke [36]). Der Widerstand der Doppellipidschicht R_M ergibt sich durch die Ionenleitfähigkeit. Da die Doppellipidschichten einen hydrophoben Kern besitzen und die Ionen von einer Hydrathülle umgeben sind, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ion die Doppellipidschicht durchdringt, sehr gering. Daher sind BLMs nahezu impermeabel für Ionen und polarisierte Moleküle [30] und es ergibt sich ein hoher elektrischer Widerstand der Membran. Weiterhin wird dem RC-Glied ein serieller Widerstand hinzugefügt, der den Elektrolyten, in dem sich die BLM befindet, repräsentiert.

Der Einfluss von Membrantransport durch Ionophore auf das Modell der Doppellipidschicht soll im Folgenden am Beispiel von Valinomycin, welches in der vorliegenden Arbeit als Ionophor verwendet wird, erklärt werden.

De Levie stellte 1975 ein Modell zum Membrantransport für konstante, alternierende Felder mit kleinen Amplituden, wie sie für die EIS üblich sind, auf [37]. Er ging dabei

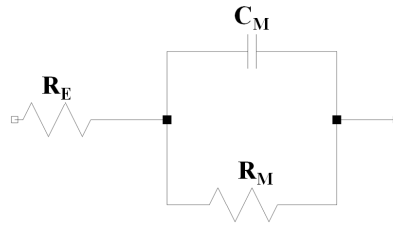


Abbildung 2.18: Ersatzschaltbild einer freistehenden Doppellipidschicht mit dem Widerstand R_M und der Kapazität C_M . Der Elektrolytwiderstand ist durch R_E dargestellt.

bei seinen Überlegungen von freistehenden Doppellipidschichten aus. Im Fall einer festkörperunterstützten Doppellipidschicht, wie in der vorliegenden Arbeit, ergeben sich durch die Anbindung an den Festkörper weitere Randbedingungen, die von C. Steinem et. al [38] in das Modell mit eingearbeitet wurden.

Ein Schema, das die Diffusion der Ionen durch ein Valinomycin-Peptid beschreibt, ist in Abbildung 2.19 gezeigt.

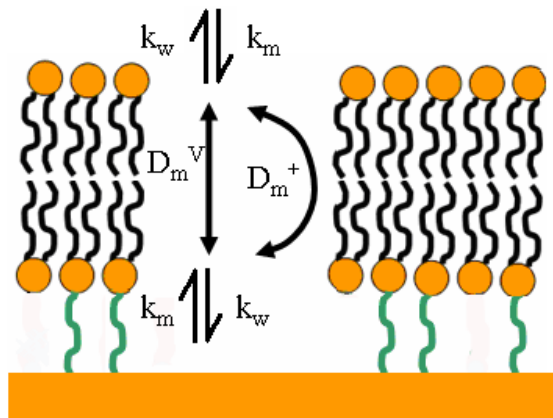


Abbildung 2.19: Gezeigt sind die Prozesse, die bei der passiven Diffusion der Ionen durch Iontentransporter beteiligt sind. D_m^+ ist die Diffusionskonstante des geladenen Transporter-Ionen-Komplexes, D_m^V ist die Diffusionskonstante des ungeladenen Transporters und k_m bzw. k_w sind die Geschwindigkeitskonstanten der Ionen an den Wasser/Membran-Grenzflächen in die bzw. aus der Membranphase heraus.

Ausgangspunkt für das Modell ist die Kontinuitätsgleichung, die den Massenerhalt und die Diffusionskomponenten der Ionen durch den Transporter beinhaltet. An der Wasser/Membran-Grenzfläche ($x=0$) ist der Fluss der Ionen durch Diffusion gleich dem Fluss des ungeladenen Transporters.

$$D_m^+ \left(\frac{\partial c_m^+}{\partial x} + \frac{zF c_m^+}{RT} \frac{\partial \phi_m}{\partial x} \right)_{x=0} = k_m^+ c_m^+ - k_w^+ c_w^+ c_m^V = -D_m^V \left(\frac{\partial c_m^V}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (2.10)$$

Hierbei ist D_m^+ die Diffusionskonstante des geladenen Transporter-Ionen-Komplexes, D_m^V ist die Diffusionskonstante des ungeladenen Transporters, k_m^+ bzw. k_w^+ sind die Geschwindigkeitskonstanten der Ionen an den Wasser/Membran-Grenzflächen in die bzw. aus der Membranphase heraus, c_m^+ , c_w^+ und c_m^V sind die Konzentrationen des geladenen Transporter-Ionen-Komplexes, der Ionen in der Wasserphase und des ungeladenen Transporters, z ist die Ladungszahl der Ionen, F ist die Faraday-Konstante und ϕ_m ist das Potential über der Membran.

Das Modell geht von folgenden Annahmen aus:

1. Der Transporter und der Ionenkomplex sind örtlich auf die Membran begrenzt.
2. Der Transporter ist ungeladen.
3. Die Ionenkonzentration in der wässrigen Lösung ist so groß, dass sie quasi unabhängig von der Menge der transportierten Ionen bleibt.
4. Die Membran ist symmetrisch bezüglich der Ebene in der Mitte der Membran und die angelegte Spannung besitzt keinen Gleichspannungsanteil.

Diese Annahmen sind für das Membransystem der vorliegenden Arbeit erfüllt. Da Valinomycin außen hydrophob ist, tendiert es dazu, in das Innere der Membran zu diffundieren. Die Valinomycin-Konzentration ist innerhalb der Membran 4-5 mal größer als in der Lösung [38]. Zusätzlich ist das Valinomycin selbst ungeladen. Daher ist der Komplex aus transportierten Ionen und dem Transporter der einzige Ladungsträger im System. Mit 0,1 M KCl der Messlösung ist die Ionenkonzentration

signifikant größer als die Ionenkonzentration in der Membran. Die beiden Lipidschichten der Membran bestehen aus der gleichen materiellen Zusammensetzung und durch die Wechselspannung um 0 V besitzt der Strom durch das Ionophor keinen Gleichstromanteil.

Mit der Randbedingung der Festkörperanbindung führen die Überlegungen zu dem Ersatzschaltbild in Abbildung 2.20. Hierbei ist R_{pt} der Widerstand, der durch den Eintritt der Ionen aus der Elektrolytphase in die Membranphase verursacht wird, und R_m der Widerstand der Membran. Da bei einer Messung nicht zwischen R_{pt} und R_m unterschieden werden kann, werden sie zu R_M zusammengefasst. C_S ist die Kapazität der elektrolytischen Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche. R_V und C_V beziehen sich auf das Valinomycin. Sie sind abhängig von der Konzentration der ungeladenen Valinomycin-Peptide in der Membranphase. Eine grobe Abschätzung zeigt, dass R_V und C_V auf Grund des hohen Widerstandes R_M vernachlässigt werden können. Diese Annahmen führen zu einem vereinfachten Ersatzschaltbild, das in Abbildung 2.21 dargestellt ist. Dies ist das gleiche, das auch für die Modellierung der Membran ohne integrierte Ionophore verwendet wird.

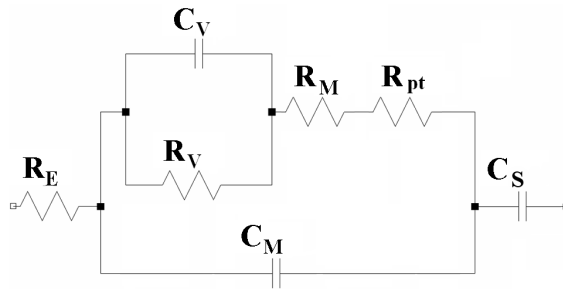


Abbildung 2.20: Ersatzschaltbild einer angebundenen Doppellipidschicht mit integrierten Valinomycin-Peptiden

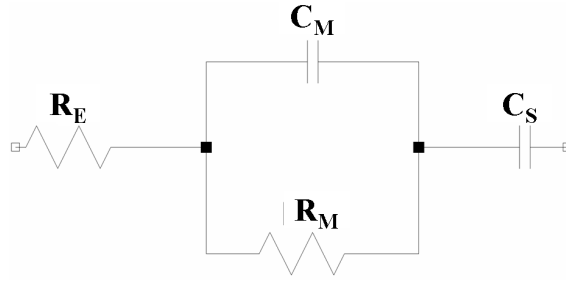


Abbildung 2.21: Ersatzschaltbild einer tBLM auf einer Goldelektrode

2.3.3 Die Spacerkapazität

Das grundlegende Modell für die Beschreibung der Spacerregion und der Grenzfläche zur Elektrode ist das Stern-Modell zur Beschreibung der Ionenverteilung an Grenzflächen. Die Region unterhalb der Membran kann in zwei Bereiche mit unterschiedlichen Kapazitäten aufgeteilt werden (vgl. Abbildung 2.22): die starre Helmholtz-Schicht mit der Kapazität C_H , in der die Ionen auf der Goldoberfläche adsorbiert sind und die diffuse Schicht mit der Kapazität C_{Spacer} , in der die Ionen zwischen Helmholtz-Schicht und der Membran verteilt sind. Die diffuse Schicht entspricht dabei der Spacerregion und dient als Ionenreservoir [39].

Durch den Transport der Ionen wird durch deren Hydrathüllen auch immer Wasser mit in den Spacerbereich transportiert, was zu einer Änderung der Permittivitätszahl $\epsilon_{r,Spacer}$ der Spacerregion führt. Wasser hat eine Permittivitätszahl von ungefähr $\epsilon_{r,Wasser} = 80$ [35]. Durch das Einschleusen von Wasser gleicht sich $\epsilon_{r,Spacer}$ immer mehr $\epsilon_{r,Wasser}$ an. Ganz kann $\epsilon_{r,Wasser}$ nicht erreicht werden, da der Raum unterhalb der Membran nicht leer, sondern mit Spacermolekülen besetzt ist. Die Änderung von $\epsilon_{r,Spacer}$ hängt daher nicht nur von der Länge, sondern auch von der Dichte der Spacermoleküle ab. Die Region kann als ein dichtes hydratisiertes Gel beschrieben werden, das eine geringere Ionenmobilität besitzt als die Elektrolytlösung [39].

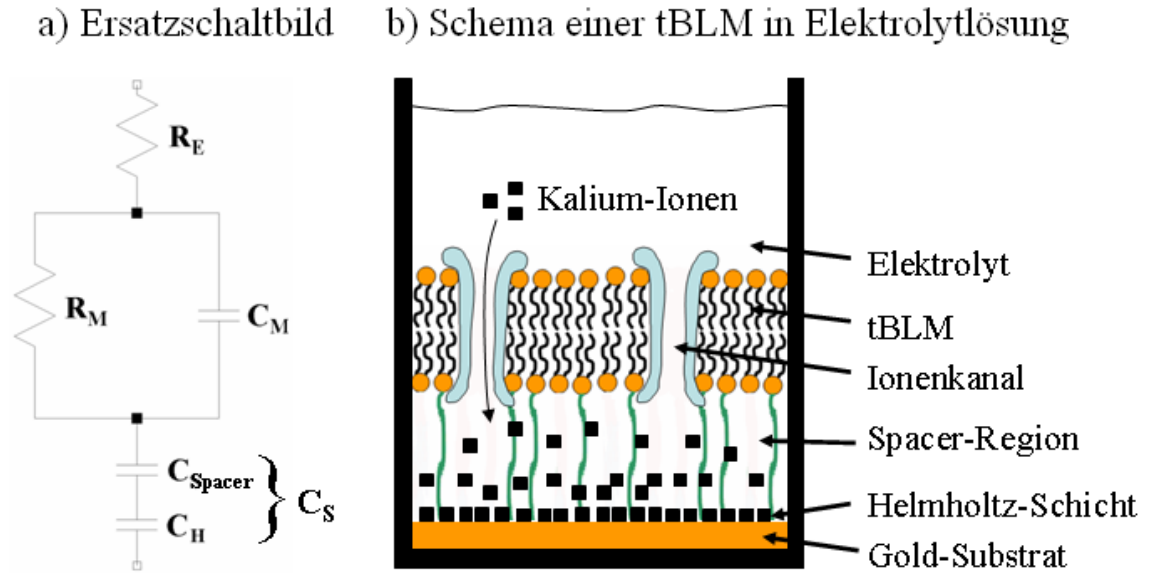


Abbildung 2.22: a) Ersatzschaltbild: Die Eigenschaften der Membran werden mit Elektrochemischer Impedanzspektroskopie bestimmt. b) Schematischer Querschnitt einer tBLM in einer Elektrolytlösung

Ist der Spacerwiderstand R_{Spacer} groß, so fallen die Kapazitäten C_{Spacer} und C_H zu einer Kapazität C_S zusammen (vgl. Abbildung 2.21). Ist R_{Spacer} nicht vernachlässigbar, so zeigt er sich im elektrochemischen Impedanzspektrum in einer weiteren Zeitkonstante. Das entsprechende Ersatzschaltbild ist in Abbildung 2.23 dargestellt.

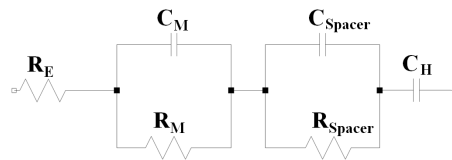


Abbildung 2.23: Ersatzschaltbild einer tBLM mit dem Spacerwiderstand R_{Spacer} .

2.3.4 Sorptionsverhalten der Analyten

Ein wichtiger Aspekt bei der Ausarbeitung eines Konzepts zur Messung einer Signaländerung ist das Sorptionsverhalten der Analyten an der Elektrodenoberfläche. Unter Sorption versteht man Vorgänge, bei denen sich Stoffe an eine Oberfläche anlagern (Adsorption) oder in einem anderen Stoff einlagern (Absorption) oder abgegeben (Desorption) werden. Der Bedeckungsgrad der Oberfläche in Abhängigkeit der Analytkonzentration kann mit Hilfe der Langmuir-Isothermen [40] beschrieben werden. Sie beschreibt die Sorption eines Stoffes unter der Annahme, dass nur eine einzige Monolage an Analytmolekülen adsorbiert werden kann, die Schicht gleichmäßig ist und somit überall die gleichen Adsorptionsverhältnisse bestehen und die Adsorption eines Moleküls nicht davon abhängt, ob eine benachbarte Bindungsstelle belegt ist [41]. Unter dem Bedeckungsgrad Θ wird im Allgemeinen

$$\Theta = \frac{\text{Anzahl der besetzten Adsorptionsplätze}}{\text{Anzahl der vorhandenen Adsorptionsplätze}} \quad (2.11)$$

verstanden.

Die Abbildungen 2.24 und 2.25 zeigen zwei mögliche zeitliche Verläufe der Sorption der Analyten. In Abbildung 2.24 geht die Annahme ein, dass nahezu keine Desorption stattfindet. Dies ist der Fall, wenn einmal gebundene Analyten an der Oberfläche (z.B. an Rezeptoren) gebunden bleiben. Das Maß für die Konzentration des Analyten in der Lösung ist hierbei die Zeit, die benötigt wird, bis eine Sättigung der Sensoroberfläche eintritt.

Ist der Prozess des Andockens reversibel, so diffundieren die Analyten zum Rezeptor hin, verweilen für einige Zeit und lösen sich danach wieder, um zu einem anderen Rezeptor zu diffundieren. Nach einer gewissen Zeit befinden sich Adsorption und Desorption im Gleichgewicht. Je nach Quotient aus Adsorptions- und Desorptionswahrscheinlichkeit stellt sich eine unterschiedliche Bedeckung Θ ein. Daher ist hierbei Θ im Gleichgewicht ein Maß für die Konzentration des Analyten in der Probelösung. Dieser Fall ist in Abbildung 2.25 dargestellt.

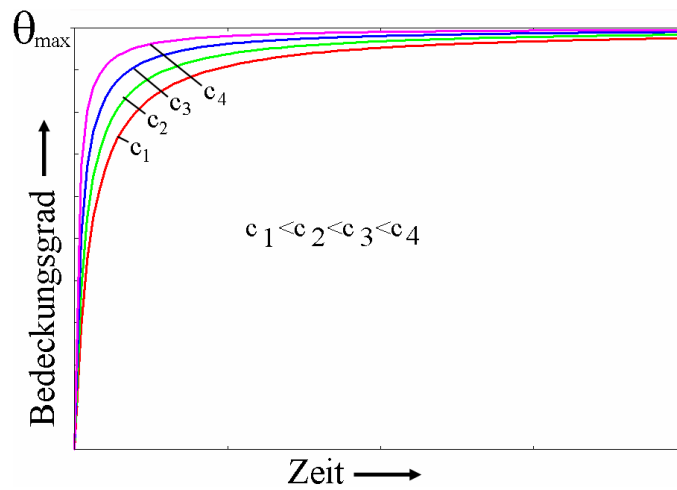


Abbildung 2.24: Zeitlicher Verlauf des Bedeckungsgrades einer Oberfläche im Fall einer in Sättigung gehenden Absorption ohne Desorption

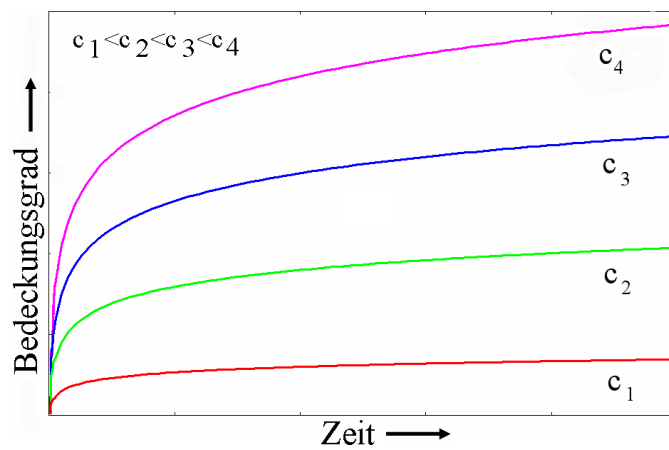


Abbildung 2.25: Zeitlicher Verlauf des Bedeckungsgrades im Gleichgewicht der Absorption und Desorption

2.4 Stand der Entwicklung

Um tBLMs in Biosensoren zu integrieren, werden verschiedene Ankermoleküle, Membrankonfigurationen und -architekturen verwendet, um die Membranen zu stabilisieren und möglichst hohe Widerstände zu erreichen [22][42][43] [44]. Ein hoher Widerstand der Membran ist für ein gutes Signal/Rauschverhältnis des Ionenstroms durch die Ionophore unerlässlich.

2.4.1 Mikroelektroden

Um kleine Membranen im Mikrometer-Bereich herzustellen, die auf Mikrochips integriert werden können, werden Mikroelektroden benötigt. Zur Herstellung der Mikroelektroden gibt es mehrere Ansätze. Ein Ansatz ist, eine Mikrofluidik aus PDMS⁴ herzustellen, die den Elektrodenbereich für die Membran abdichtet. PDMS ist ein chemisch inertes, durchsichtiges, elastisches Silikon, das im flüssigen Zustand in Formen gegossen werden kann und dann erstarrt. So können Masken hergestellt werden, um einen Elektrodenbereich abzugrenzen [45].

Becucci et al. [46] berichten von der Herstellung einer Mikroelektrode aus einem

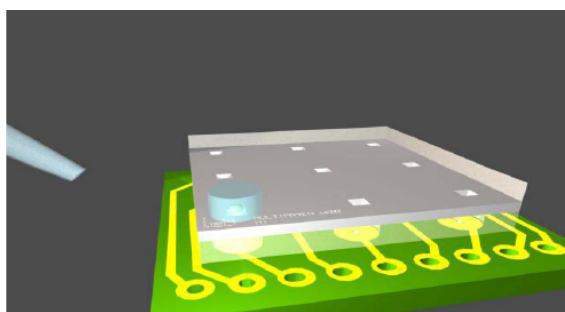


Abbildung 2.26: PDMS-Matrix für Mikroelektroden [45]

Platindraht. Der Platindraht mit einem Durchmesser von $20\text{ }\mu\text{m}$ wurde in eine Glaskapillare eingebracht und dadurch abgedichtet. Die Querschnittsfläche des Drahtes,

⁴Polydimethylsiloxan

die aus der Kapillare ragt, wurde zunächst poliert. Im Anschluss wurde durch einen Galvanikprozess das Elektrodenmaterial Blei abgeschieden. So entsteht eine Mikroelektrode mit einem Durchmesser von $20\text{ }\mu\text{m}$.

Eine weitere Möglichkeit ist es, die Elektroden mit Mikrosystem-Technik-Prozessen herzustellen. Hierbei kann ein Array von Mikroelektroden gefertigt werden, das es erlaubt, eine Probe platzsparend auf verschiedene Analyten gleichzeitig zu untersuchen. Zusätzlich kann durch gleichzeitige Messungen mit mehreren Elektroden über diese gemittelt werden und es kann ein genaueres Ergebnis ermittelt werden, da die Elektroden herstellungsbedingt leicht unterschiedlich sind. Da in der Biosensorik häufig Elektrodenmaterialien verwendet werden, die im CMOS-Prozess nicht zur Verfügung stehen, z.B. Gold, Platin, Silber oder Blei, werden die Elektroden meist nachträglich in einem Post-CMOS-Prozess gefertigt und in die CMOS-Schaltung integriert.

Hassler et al. [47] nutzen hierbei einen Vier-Masken-Prozess auf einem passivierten CMOS-Mikrochip um ein Drei-Elektrodensystem herzustellen. Die Arbeitselektrode für die Lipidmembran und die Gegenelektrode bestehen hierbei aus einem Titan-Gold-Schichtstapel, die Referenzelektrode wird zusätzlich mit Silber-Silber-Chlorid beschichtet, wobei diese Schicht mit einer Nafion-Schicht, die den Ionenfluss von der Referenzelektrode erlaubt, vor der Umgebung geschützt wird. Dieses Sensorsystem wird in der elektrochemischen Impedanzspektroskopie eingesetzt.

Von entscheidender Bedeutung für eine gut isolierende Membran ist der Rand der Mikroelektrode [48], da dieser eine Schwachstelle im System darstellt. Um am Rand der Elektrode einen hohen elektrischen Widerstand zu erreichen, verwenden Cornell et al. [48] eine Kombination aus hydrophobem Silizium-Nitrid und einem hydrophilen Titanring (Abbildung 2.27). Durch das hydrophobe Silizium-Nitrid reicht die Membran über den Bereich der Kante hinaus und bindet zusätzlich an das Si_3N_4 . Der Titan-Ring sorgt für einen kleinen Kontaktwinkel der wässrigen Probenflüssigkeit.

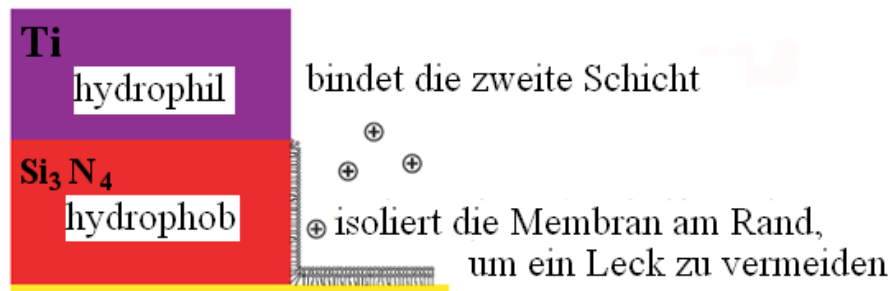


Abbildung 2.27: Die Kombination aus Silizium-Nitrid und Titan stellt eine elektrische Isolation dar, die ein Ionen-Leck vermeidet [48].

2.4.2 Detektion von Antikörpern

Bruce A. Cornell hat ein Prinzip gefunden, mit dem es möglich ist, angebundene Doppellipidschichten zur Detektion von Antikörpern zu verwenden [49]. Hierfür wird der Ionenkanal Gramicidin A [50] in eine tBLM eingebaut. Schematisch ist dies in Abbildung 2.28 gezeigt.

Gramicidin ist ein Ionenkanal, der aus zwei Teilen besteht, die sich jeweils lateral frei innerhalb der Membran bewegen können. Ein Teil befindet sich dabei in der oberen Hälfte der Doppellipidschicht, der andere Teil in der unteren. Ein durch die Membran durchgehender Kanal ist nur geöffnet, wenn sich zu einem Zeitpunkt zwei Teile übereinander befinden. In diesem Fall können Ionen die Membran passieren. Durch die laterale Bewegung des Gramicidin in der Membranebene kommt es häufig zur Kanalbildung und damit zu einem Ionenfluss durch die Membran hindurch. Cornell ist es gelungen, den Kanal so zu modifizieren, dass der obere Teil des Gramicidin mit einem Antikörper funktionalisiert ist. Der untere Teil wird an der Substratoberfläche befestigt. Ohne passendes Antigen, das nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip [51] an den Antikörper andockt, kann sich der obere Teil des Gramicidin A frei bewegen und der Ionenfluss bleibt bestehen. Bei einer passenden Bindung wird der obere Teil des Kanals fixiert. Er ist nun nicht mehr frei beweglich und es kann sich kein Kanal ausbilden. Die beiden Zustände bewirken eine Änderung des Membran-Widerstandes, welche im Fall des Biosensors von Cornell mit elektrochemischer Impedanzspektro-

skopie ausgelesen wird.

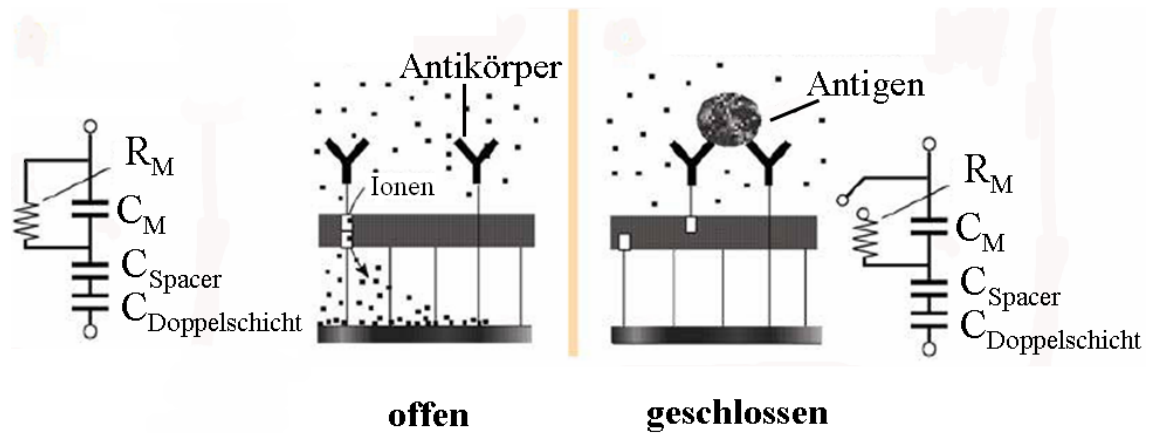


Abbildung 2.28: Von Cornell entdecktes Prinzip zur Detektion von Grippe-Viren

2.4.3 CMOS-Integration verschiedener Messverfahren

Um Messmethoden für Biosensoranwendungen zu nutzen, ist es sinnvoll, sie auf einem CMOS-Chip zu integrieren.

Gängige Methoden zur Untersuchung von Ionophoren in Doppellipidschichten sind die Elektrochemische Impedanzspektroskopie, das Patch-Clamp-Verfahren und optische Verfahren.

Eine Variante EIS-Messungen durchzuführen, ist die Stimulation des Sensorelementes mit einem Puls und der anschließenden Verarbeitung mit einem Fast-Fourier-Transformation Algorithmus (FFT) [52]. Der Vorteil der Anregung mit einem Puls, bestehend aus mehreren Frequenzen, liegt in der Zeiteinsparung. Allerdings nehmen FFT-Schaltungen sehr viel Platz ein und viele Rohdaten müssen off-chip extern bearbeitet werden [53], so dass die FFT-Methode zur Integration in CMOS eher ungeeignet ist.

Eine andere Variante der EIS besteht in der Frequenzgang-Analyse, die den Vorteil hat, dass sie genauer ist. Der Nachteil der herkömmlichen FRA-Labor-Messgeräte

liegt jedoch in der Größe der Messgeräte und in der Dauer der Messung. Es muss ein Impedanzspektrum aufgenommen werden, das in der Regel eine Stunde dauert, da sich biologische Prozesse im niederfrequenten Teil des Frequenzspektrums von wenigen Millihertz zeigen. Da zumindest eine Periode der jeweiligen Frequenz gemessen werden muss, ergeben sich z.B. für 1 mHz ungefähr 15 Minuten und damit lange Messzeiten. Schnelle Veränderungen des Testsystems können also nicht beobachtet werden.

Yang et al. haben eine neue Methode mit einem Algorithmus, integriert auf einem CMOS-Chip, entwickelt, mit dem das Auslesen der Sensoren schneller abläuft [53]. Hierbei werden zwei identische Sensoren gleichzeitig ausgelesen. So werden Messungen innerhalb von 10 s möglich. Das Ergebnis wird aus einem Admittanz-Graphen abgelesen. Ein Nachteil, der allerdings weiterhin besteht, ist, dass das Messergebnis aus einem Graphen abgelesen werden muss.

Eine andere Möglichkeit, Ionophore in Lipid-Doppelschichten zu charakterisieren, bietet das Patch-Clamp-Verfahren (vgl. Abbildung 2.29). 1976 veröffentlichten Erwin Neher und Bert Sakmann Messungen, bei denen es zum ersten Mal gelungen war, Ströme einzelner Ionenkanäle in einer Zelle zu messen [54]. Ermöglicht wurden die Messungen der geringen Ströme von 5 pA durch die Isolation (im Giga-Ohm-Bereich) eines kleinen Bereiches der Zelle durch eine Glaspipette von der umgebenden Flüssigkeit. Die Glaspipette wird auf die Zelle aufgesetzt, wobei ein Unterdruck erzeugt wird, so dass die Zelle ein Stück weit in die Glaspipette eingesaugt wird. Somit können Ströme von wenigen Pico-Ampère gemessen werden. Das Verfahren wird Patch-Clamp-Methode genannt.

Durch den geringen Durchmesser der Austrittsöffnung der Pipette wird mit hoher Wahrscheinlichkeit erreicht, dass sich nur ein einzelner Ionenkanal im Messfokus befindet. Das Innere der Glaspipette ist mit einer Elektrolyt-Lösung gefüllt, in die ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht eingebettet ist. Eine weitere Silber-Silberchlorid-Elektrode befindet sich außerhalb der Zelle in der umgebenden Flüssigkeit. Es wird eine kleine Spannung von einigen Millivolt angelegt und der

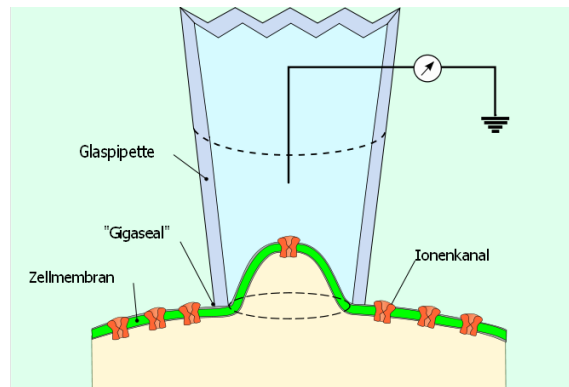


Abbildung 2.29: Patch-Clamp-Verfahren [55]

dazugehörige Strom gemessen. Es ist auf einen geringen Abstand der Elektroden untereinander und zum Verstärker zu achten, um Störsignale zu vermeiden. Nur so ist es möglich die sehr geringen Ströme zu messen.

Auch beim Patch Clamp gibt es Bemühungen, das Verfahren auf einem Chip zu integrieren. Weerakoon et al. verwenden hierfür ganze Zellen. Der wesentliche Unterschied zum konventionellen Verfahren besteht darin, die Glas-Pipette durch eine Öffnung in einer CMOS-Struktur zu ersetzen (vgl. Abbildung 2.30). Werden Zellen verwendet, so werden diese durch die Öffnung angesaugt. Der Vorteil ist, dass die aufwändige Mikro-Justage der Pipette entfällt. [56]

Optische Verfahren arbeiten häufig mit der Fluoreszenzspektroskopie. Hierbei wird der Analyt vor der Messung mit einem Fluorophor markiert. Eine Bindung zwischen Rezeptor und Analyt kann durch Bestrahlung der Probe mit ultravioletttem Licht sichtbar gemacht werden, da das Licht das Fluorophor zur Fluoreszenz anregt. Coskun et al. haben hierfür ein System entwickelt, dass ohne Linsen arbeitet, wodurch eine Miniaturisierung möglich wird. Die Fluoreszenz-Objekte werden direkt auf einem CCD-Array (Charge Coupled Device) positioniert [57].

Ein weiteres, häufig verwendetes optisches Verfahren ist die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) -Spektroskopie. Diese hat bereits ein miniaturisiertes Produkt hervorgebracht. Das von Texas Instruments 1996 entwickelte "Spreeta" ist Halbleiterbasiert. Die benötigte optische Oberfläche für die SPR-Schicht, die Spiegel und die

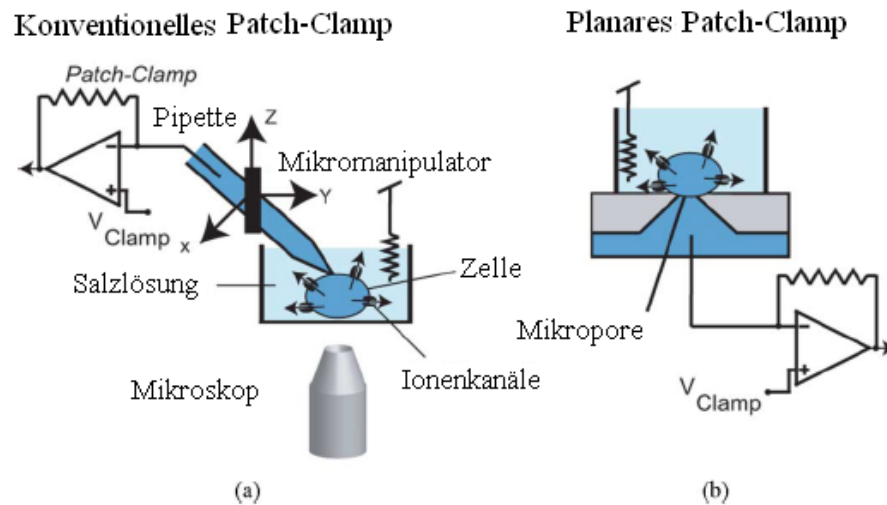


Abbildung 2.30: a) Konventionelles Patch-Clamp-Verfahren mit einer Glas-Pipette, b) Planares Patch-Clamp durch eine Öffnung in einer CMOS-Struktur [56]

Fokussierung werden von einem optischen Material dargestellt, mit dem der Sensor verkapselt wird. Zusätzlich schützt die Verkapselung die einzelnen Komponenten vor Umwelteinflüssen. [58] Das Produkt wurde jedoch bereits wieder vom Markt genommen.

Temiz et al. verwenden einen Messaufbau mit einer Integratorschaltung, tBMLs und dem Ionenkanal Gramicidin. Der Nachweis des Gramicidin erfolgt über die Messung der Widerstandsänderung der Doppellipidschicht. Hierbei wird das Testsystem mit einer kleinen Wechselspannung (50 mV) angeregt. Die Frequenz wird so gewählt, dass sie im membranwiderstandsdominierten Bereich liegt, um die Signaländerung zu maximieren. [59]

Unerwähnt bei den bisher genannten Methoden bleibt jedoch, dass sich nicht nur der Membranwiderstand, sondern auch die Spacerkapazität ändert. Vockenroth et al. zeigen dies für den Ionenkanal AChR M2. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Effekt abhängig vom verwendeten Spacer ist. Der Grund für die Änderung der Spacerkapazität liegt in der Änderung der Ionenkonzentration in der Spacerregion[24].

Da die Änderung der Spacerkapazität kleiner ist als die Änderungen des Membran-

widerstandes, wurde der Effekt bislang nicht für Biosensoranwendungen genutzt. Für die CMOS-Integration einer Sensorschaltung ist die Spacerkapazitätsänderung jedoch ein interessanter Aspekt. Da der Widerstand der Membranen auf Mikroelektroden üblicherweise im Gigaohm-Bereich liegt, ist dieser für eine Auswertung mit CMOS-Schaltungen ungünstig. Hohe Widerstände R verursachen eine hohe Rauschspannung $U_R = \sqrt{4k_B T \cdot \Delta f \cdot R}$ (k_B Boltzmannkonstante, T Temperatur und Δf Bandbreite), Kapazitätsänderungen hingegen können mit einer hohen Auslesegenauigkeit bestimmt werden, was bereits hier am Institut gezeigt wurde [60].

2.5 Biosensorkonzept der vorliegenden Arbeit

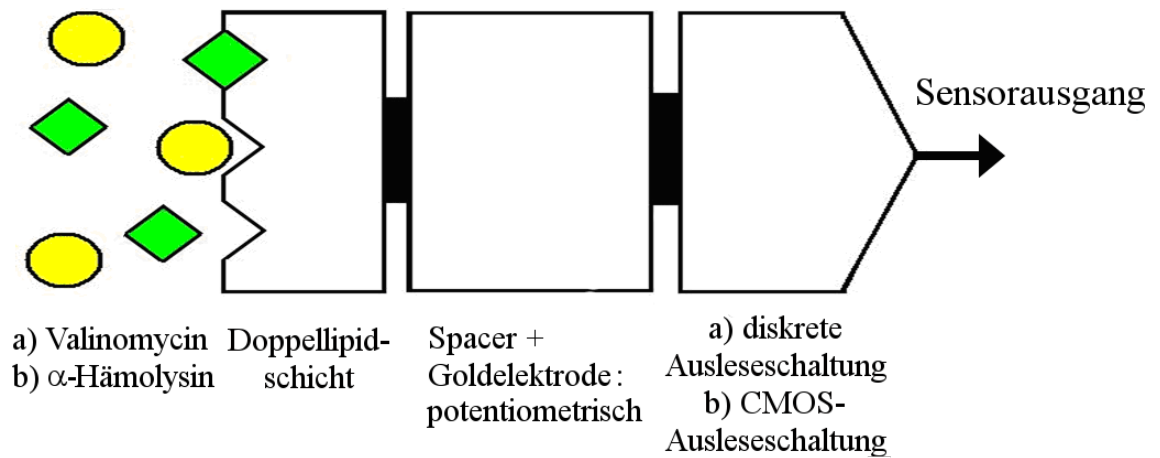


Abbildung 2.31: Biosensorkonzept der vorliegenden Arbeit

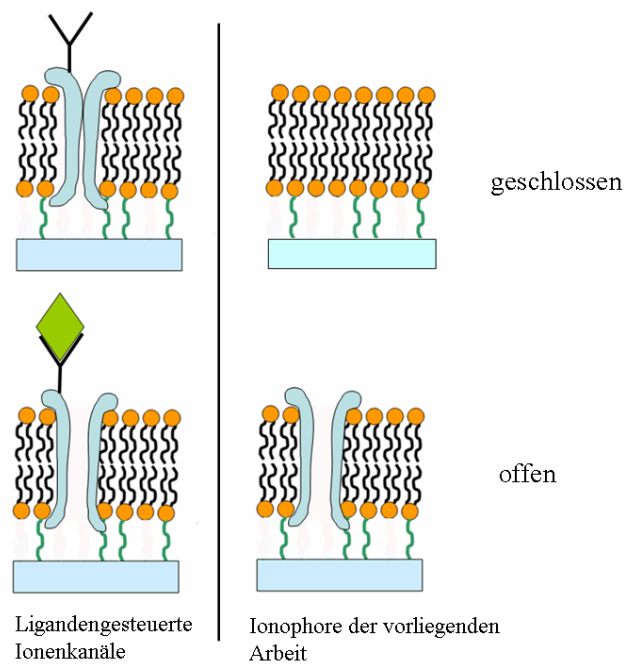


Abbildung 2.32: Definition der Zustände "offen" und "geschlossen" im Fall von ligandengesteuerten Ionenkanälen und den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ionophoren

Das Biosensorkonzept des in der vorliegenden Arbeit entwickelten Biosensors basiert auf einem kapazitiven Ausleseprinzip und ist in Abbildung 2.31 dargestellt. Das Erkennungselement des Sensors ist eine Doppellipidschicht, die die Ionophore Valinomycin und auch α -Hämolysin absorbieren kann. Die Doppellipidschicht ist über einen Spacer an eine Goldelektrode gebunden. Der Spacer fungiert hierbei als Transduktor, da das Absorbieren der Ionophore in eine Kapazitätsänderung des Spacers umgewandelt wird. Abbildung 2.32 (rechter Teil) zeigt die Kapazitätszustände ohne Ionophore ("geschlossen") und mit Ionophoren ("offen").

Nach der Umwandlung des Signals (Absorption der Ionophore) wird die Spannung, die über der Gesamtkapazität aus Membrankapazität und Spacerkapazität abfällt, mit Hilfe einer Ausleseschaltung gemessen und verstärkt. In der vorliegenden Arbeit werden zwei verschiedene Ausleseschaltungen verwendet. Mit einer diskreten Ausleseschaltung, die auf einer Platine aufgebaut ist und entsprechend noch modifiziert werden kann, wird zunächst gezeigt, dass die Spacerkapazität ein Maß für die Ionophorkonzentration ist und daher das gewählte Konzept der potentiometrischen Auslese für die Biosensoranwendung mit Ionophoren geeignet ist.

Im nächsten Schritt wird eine CMOS-Ausleseschaltung verwendet, um zu zeigen, dass die Messmethode integrierbar ist.

Der wesentliche Unterschied zu anderen Biosensorkonzepten, die Ionophorkonzentrationen in tBLMs auslesen, liegt in der Messgröße. Andere Biosensorkonzepte nutzen die Membranwiderstandsänderung als Messgröße. Im Biosensorkonzept der vorliegenden Arbeit wird ein anderer Ansatz gewählt. Es wird die Änderung der Spacerkapazität ausgelesen. Dabei wird die hohe Auslesegenauigkeit von Kapazitäten durch "Switched-Capacitor-Schaltungen" ausgenutzt. Durch die Schaltfrequenz im Kilo-Hertz-Bereich ist ein dynamisches Auswerten im Millisekunden-Bereich möglich. Dies ist ein Vorteil gegenüber Verfahren, die mit elektrochemischer Impedanzspektroskopie arbeiten, da hierbei durch die notwendigen Messungen im Millihertz-Bereich sehr lange Messzeiten entstehen. Gleichzeitig kann markerfrei gearbeitet werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber optischen Verfahren, bei denen das Analyt-

molekül beispielsweise zuvor mit einem Fluorophor für die Fluoreszenzspektroskopie markiert werden muss. Ein weiterer Vorteil des Ansatzes ist, dass in Flüssigkeiten gemessen werden kann. Dies ermöglicht z.B. die Untersuchung diverser Körperflüssigkeiten, wie Serum, Speichel und Urin. Weiterhin kann das Verfahren so automatisiert werden, dass die Ausgangsspannung direkt in einen Konzentrationswert umgewandelt und ausgegeben wird.

Um den Biosensor kommerziell einzusetzen, muss das Messprinzip auf verschiedene Analyten angewendet werden können. Hierfür muss das Erkennungselement flexibler sein, als die für den Proof-of-Concept in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ionophore. Nach dem erfolgreichen Nachweis des Sensorprinzips ist es geplant in die Membran eingebaute ligandengesteuerte Ionenkanäle als Erkennungselement einzusetzen. In diesem Fall sind die Analytmoleküle Liganden, wie z.B. Hormone. Abbildung 2.32 (linker Teil) zeigt die beiden Kapazitätzustände im Fall von geöffneten und geschlossenen Ionenkanälen. Die ligandengesteuerten Ionenkanäle besitzen Rezeptoren, die künstlich modifiziert werden können. Somit können sie spezifisch auf verschiedene Analyten zugeschnitten werden und es ergibt sich ein weites Anwendungsfeld von z.B. Allergenen, Antikörpern und Hormonen.

3. Untersuchungsansätze und -methoden

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Biosensor besteht aus zwei Komponenten: Der Sensorausleseschaltung und der Sensorelektrode mit der Membran, die an die Sensorausleseschaltung angeschlossen wird. Zur Verifizierung des Sensorprinzips werden zwei verschiedene Ausleseschaltungen verwendet: Eine diskrete, bei der die Bauelemente auf einer Platine aufgebaut sind und eine CMOS-Ausleseschaltung, integriert auf einem Chip.

Für die diskrete Schaltung werden Makroelektroden mit einem Durchmesser von 6 mm hergestellt. Für die CMOS-Ausleseschaltung werden $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ Mikroelektroden verwendet, wobei die Mikroelektroden und der Chip getrennt voneinander hergestellt werden. Dies hat zwei Gründe: Erstens besteht die Sensorelektrode aus Gold, was aus Kontaminationsgründen nicht im CMOS-Prozess verwendet werden darf und zweitens kann das Verfahren, welches zur Herstellung der Sensorelektrode verwendet wird, nur auf Wafer-Bruchstücken angewandt werden und nicht auf Wafer-Ebene. Daher wird die Elektrode nachträglich an den Sensorchip angeschlossen.

Die Herstellung der Sensorelektrode mit der Membran erfolgt in zwei Hauptschritten.

Zunächst wird die Elektrode gefertigt und anschließend die Membran aufgebracht. Vervollständigt wird das Messsystem durch den Einbau von Ionophoren, um das Messprinzip zu testen.

Der Prozessflow ist in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt und in den nachfolgenden Abschnitten erklärt. Zuerst wird die Membran mit Hilfe der EIS charakterisiert.

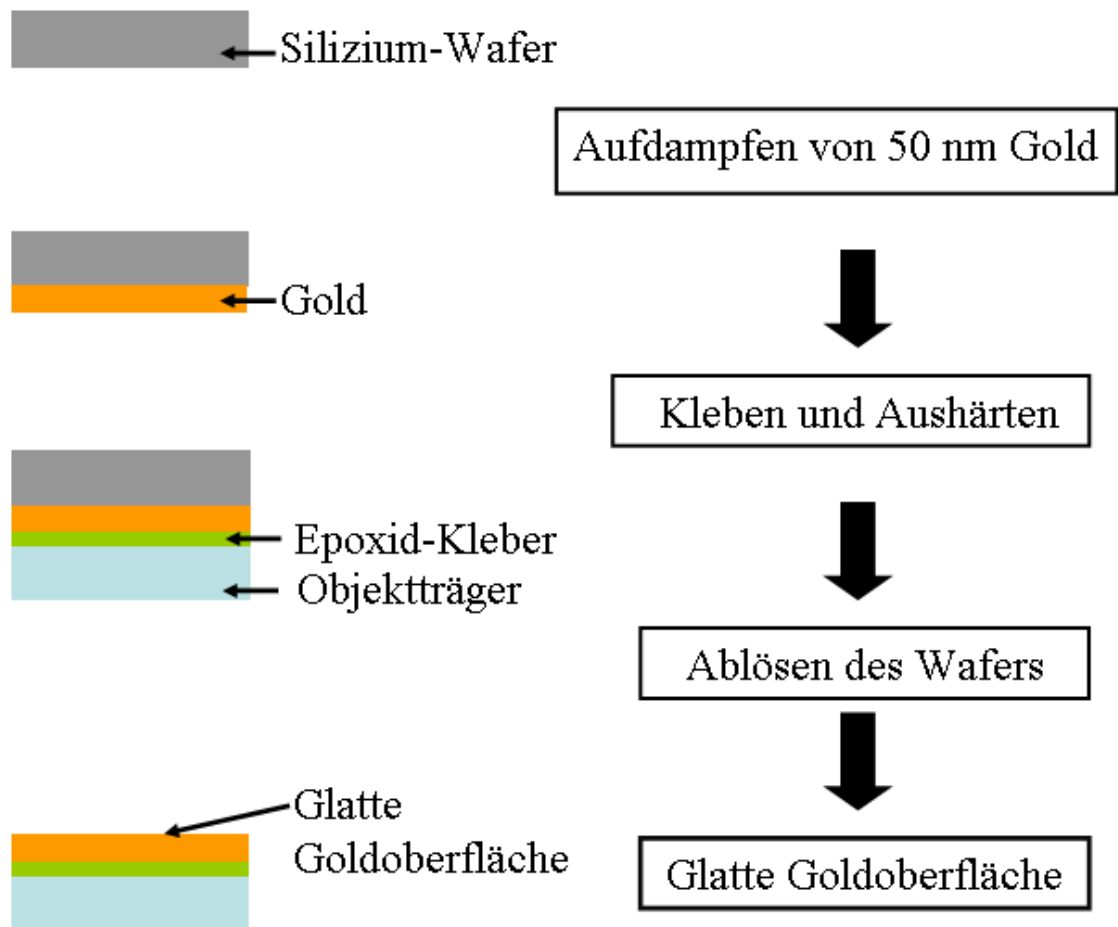


Abbildung 3.1: Herstellung der Elektroden mit Hilfe des "template stripped gold"-Verfahrens

Zur Überprüfung der Funktion wird die Elektrode mit der Membran an die (diskrete b.z.w. die CMOS-) Sensorausleseschaltung angeschlossen.

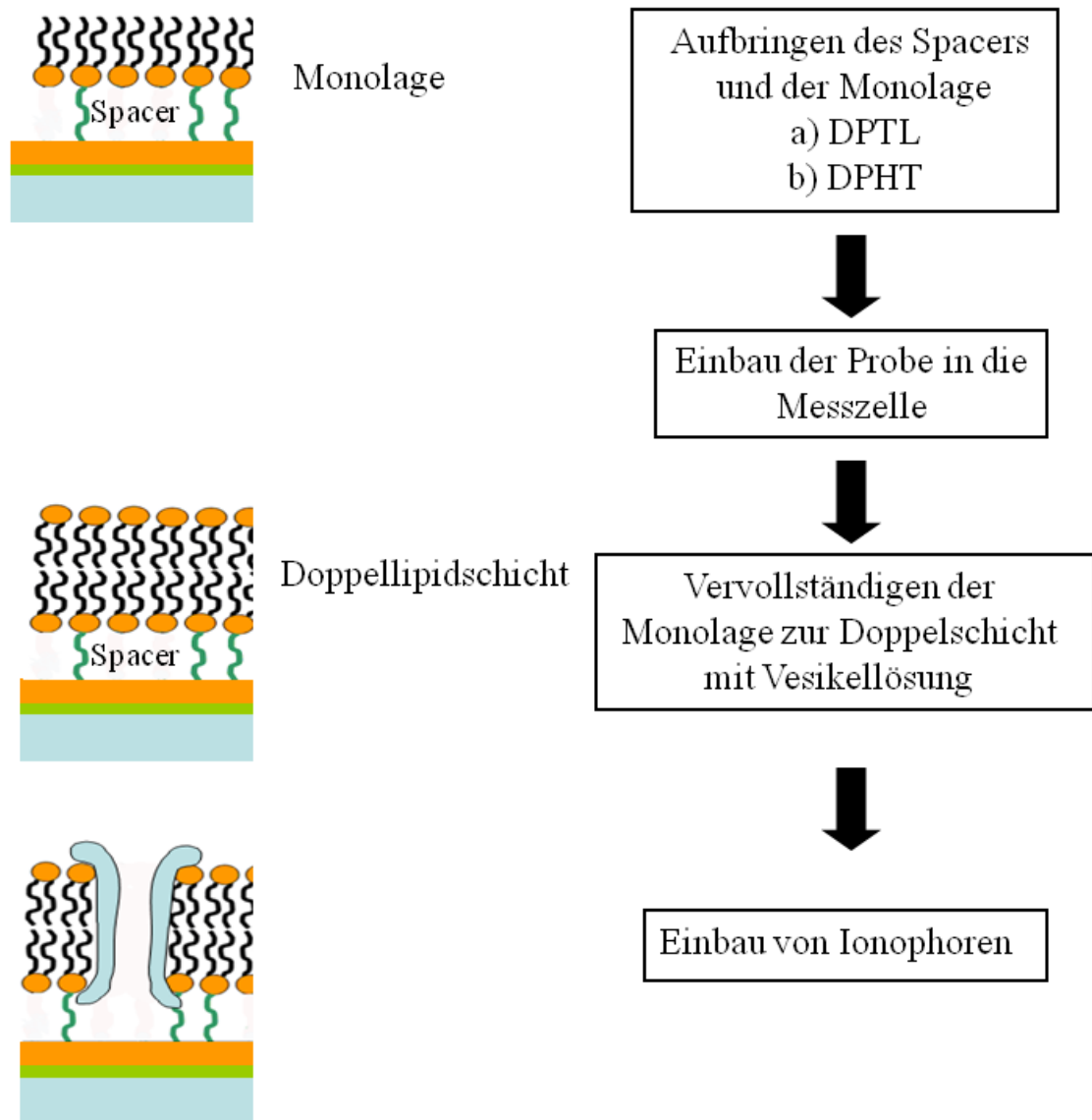


Abbildung 3.2: Herstellung der Membranen

3.1 Herstellung der Membran

3.1.1 Herstellung einer Gold-Elektrode

Um eine gut isolierende Membran auf einer Goldelektrode herzustellen, ist eine geringe Oberflächenrauheit der Elektrode von nicht mehr als 0,5 nm erforderlich [61]. Hierbei ist die mittlere Rauheit im kleinen Skalenbereich von wenigen Mikrometern entscheidend. Für Unebenheiten, die sich über größere Bereiche ausdehnen, z.B. eine wellige Oberfläche, ist der Einfluss zu vernachlässigen. Der Einfluss einer rauen Oberfläche auf eine tBLM ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Ist die Oberfläche zu rau, dann entstehen z.B. durch Schichtdickenunterschiede der Goldschicht Defekte in der Membran, da die Lipide der Monolage zu weit auseinander liegen. Derart glatte Oberflächen können im Prozess der Mikrochip-Fertigung nicht erreicht werden. Daher wird die Sensoroberfläche nachträglich gefertigt und an eine Elektrode auf dem Chip angekoppelt.

Zur Herstellung der Elektrode wurde die so genannte TSG ("Template Stripped

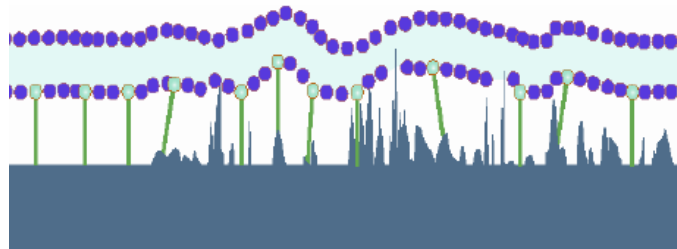


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Einflusses einer rauen Substratoberfläche auf tBLMs [62]

Gold")- Methode [63] angewandt (Abbildung 3.1). Hierbei wird die geringe Oberflächenrauheit von Silizium-Wafern ausgenutzt. Das Verfahren hat den Vorteil, dass nicht die Oberfläche des aufgedampften Goldes, die zu rau wäre, der Sensoroberfläche entspricht, sondern die Grenzfläche zwischen dem Gold und dem Silizium-Wafer. Für das Verfahren wird 50 nm Gold auf 4 cm x 2,5 cm große Silizium-Wafer-Stücke aufgedampft. Anschließend werden die mit Gold bedampften Silizium-Wafer-Stücke

auf Objektträger geklebt. Als Klebstoff wurde der Zwei-Komponenten-Epoxid-Kleber 353ND-4 der Firma EPO-TEK verwendet. Dieser ist Ethanol-resistent, was für die Prozessschritte beim Ankoppeln der tBLM erforderlich ist, da das Ankoppeln der Monolage der Membran in Ethanol erfolgt. Um Luftbläschen in der ausgehärteten Klebstoffschicht zu vermeiden, was Defekte in der Goldschicht zur Folge hätte, wurde der Kleber bei einem Druck von 10^{-3} mbar eine Stunde lang ausgegast. Das Aushärten des Klebers erfolgt bei 150°C für 30 Minuten in einem Ofen.

Da das Gold auf dem Silizium eine sehr geringe Haftung besitzt, ist ein nachträgliches Entfernen des Silizium-Waferstückchens an der Grenzfläche Gold-Si-Wafer (das "Strippen") mit einem Skalpell möglich. Die Rauheit der fertigen Goldoberfläche entspricht daher der des Silizium-Wafers, was im Bereich $<0,5\text{ nm}$ liegt. Überprüft werden kann die Rauheit der Goldoberfläche mit einem AFM (Rasterkraft-Mikroskop¹).

3.1.2 Bildung einer Monolage

Es wird eine Monolage, bestehend aus Molekülen, die wiederum aus einem Lipid- und einem Spacerteil bestehen, auf die Goldschicht aufgebracht. Die Moleküle, die aus dem Lipid und dem Spacer bestehen, werden in einem Labor synthetisiert. Die Moleküle, die in der vorliegenden Arbeit verwendet werden, wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Ingo Köper (Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) synthetisiert [38]. Es stehen zwei verschiedene Moleküle mit unterschiedlichen Spacern (DPTL und DPHT (s. Abbildungen 2.10 und 2.11)) zur Verfügung. Die beiden Moleküle unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Länge der Molekülketten und ihrer Stabilität. Während des Forschungsaufenthaltes an der Flinders University in Adelaide, Australien wurden die beiden Spacer-Moleküle hinsichtlich ihrer Eignung für die Biosensor-Anwendung untersucht.

Zur Beschichtung mit der Monolage wird der Objektträger mit der Goldschicht in eine Ethanol-Lösung eingelegt, in der die Moleküle gelöst sind. Der Spacer besitzt

¹Atomic Force Microscope

an einem Ende eine Thiol-Gruppe über die die Moleküle kovalent an die Goldoberfläche binden. Durch Selbstorganisation entsteht so eine Schicht aus Lipiden. Der Bedeckungsgrad der Oberfläche mit Molekülen ist von entscheidender Bedeutung für die Eigenschaften der Membran. Ist der Bedeckungsgrad zu niedrig, kann keine geschlossene Fläche entstehen. Es bilden sich Defekte, die sich auf den Widerstand der Membran auswirken. Ist allerdings der Bedeckungsgrad zu groß, so bleibt zu wenig Platz zwischen den einzelnen Spacer-Ketten. Dies erschwert den Einbau von Ionenphoren. Ein Maß für den Bedeckungsgrad ist der Kontaktwinkel. Je hydrophober die Oberfläche, desto mehr Moleküle sind mit der Oberfläche eine Bindung eingegangen. Oberflächen mit Kontaktwinkeln größer als 90° werden als hydrophob bezeichnet. Die Hydrophobizität kann mit einem Kontaktwinkel-Messgerät überprüft werden. Eine Konzentration von 0,2 mg/ml in Ethanol und eine Wirkzeit von 24 Stunden hat sich als erfolgreich erwiesen [63]. Der Kontaktwinkel (vgl. Abbildung 3.4) für DPTL beträgt dann ca. 108° und der für DPHT 106° [25]. Nach 24 Stunden wird die Probe mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Da der Monolayer eine hydrophobe Oberfläche besitzt, ist die Probe an Luft in dieser Form stabil.

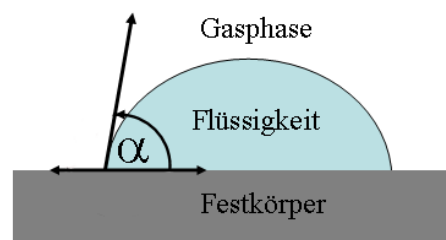


Abbildung 3.4: Kontaktwinkel α

3.1.3 Makro- und Mikroelektroden

Für eine elektrische Charakterisierung wird die Membran auf der Goldschicht in eine Messzelle aus Teflon eingebaut (vgl. Abbildung 3.5). Je nach Ausleseschaltung (diskret oder CMOS basiert) unterscheidet sich jedoch die Elektrodengröße. Für die

diskrete Ausleseschaltung werden Makroelektroden verwendet. Diese werden durch die Verwendung eines 6 mm O-Rings (Abbildung 3.5), der in der Messzelle auf die Goldoberfläche gepresst wird, definiert.

Für die CMOS-Ausleseschaltung werden Mikroelektroden mit einer Größe von

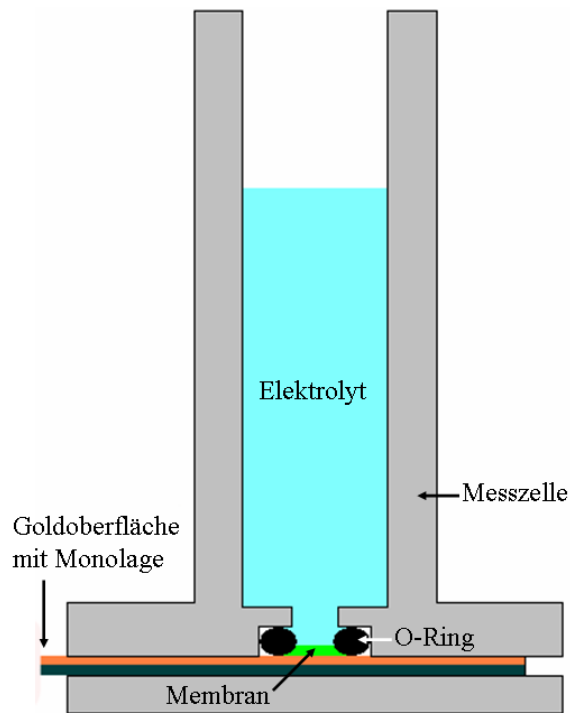


Abbildung 3.5: Schematischer Querschnitt der Messzelle aus Teflon

$100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ verwendet. Die Realisierung der Mikroelektroden stellt aufgrund der speziellen Anforderungen der Doppellipidschicht eine große Herausforderung dar. Neben der benötigten geringen Rauheit der Elektrodenoberfläche und Gold als Elektrodenmaterial, ist die Isolation der Membran am Rand der Elektrode ein Problem, da nicht genau bekannt ist, wie sich die Lipide am Rand verhalten. Dies ist auch abhängig von der Rauheit und der Hydrophobizität der Elektroden und des Isolierungsmaterials. Ist die Isolation des Randes der Membran nicht gewährleistet, so entsteht ein Leck und Ionen können dort zur Elektrode gelangen.

Eine geeignete Abgrenzung der Elektroden-Fläche (vgl. Abbildung 3.6) bieten PDMS-Masken. Hierfür wird eine Gussform mit entsprechenden Strukturen hergestellt und

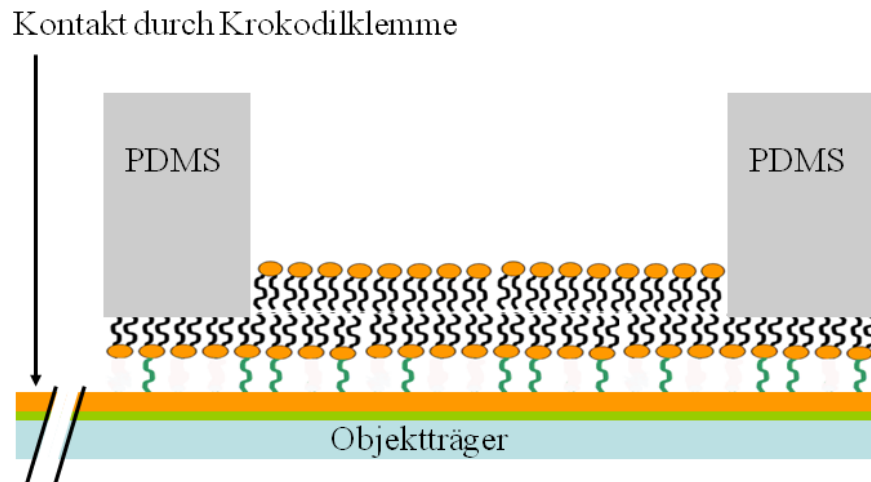


Abbildung 3.6: Mikroelektroden mit tBLMs

das PDMS in dieser ausgehärtet. So entstehen PDMS-Masken mit einer Dicke von ca. $200\text{ }\mu\text{m}$ und Fenstern mit einer Größe von $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$, welche die Elektrodengröße festlegen (vgl. Abbildung 3.7). Die Isolierung der Membran am Rand der Elektrode wird dadurch erreicht, dass die PDMS-Maske, wie der O-Ring bei den Makroelektroden, erst nach der Beschichtung der Goldoberfläche mit der Monolage auf die Goldoberfläche aufgebracht wird. Durch das vorherige Aufbringen der Monolage befindet sich auch schon unter der PDMS-Maske eine Lipidschicht. Der Spacer hat bereits einen hohen Widerstand, wodurch der Rand isoliert ist. Zusätzlich ist das PDMS hydrophob. So können die Lipide der Vesikel dort besser haften. Die PDMS-Masken wurden vom Fraunhofer FIT in Sankt-Augustin hergestellt.

Die Maske muss nicht geklebt werden, da das PDMS gute Hafteigenschaften besitzt. Es reicht daher, die PDMS-Maske mit einem O-Ring an die Goldoberfläche anzupressen.

Nach dem Einbau in die Messzelle wird die Monolage mittels EIS charakterisiert. Für die Messung wurde eine $0,1\text{ M}$ Kalium-Chlorid-Lösung als Elektrolyt verwendet.

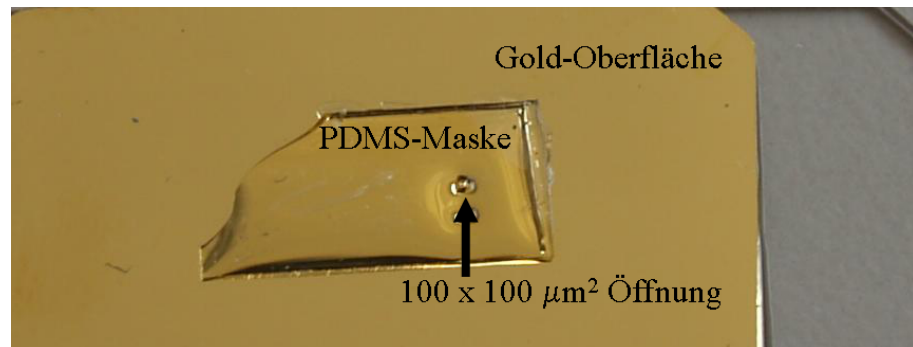


Abbildung 3.7: PDMS-Maske zur Elektrodendefinition auf einer Goldoberfläche.

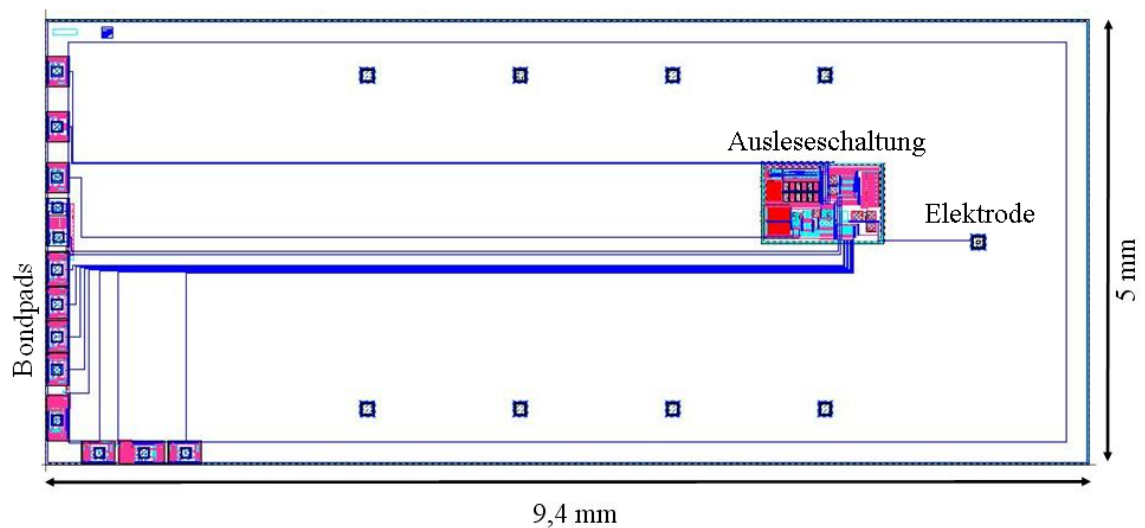


Abbildung 3.8: Layout des CMOS-Chips.

3.1.4 Bildung der Doppellipidschicht durch Vesikellösung

Die Vervollständigung der Monolage zur Doppellipidschicht erfolgt durch die so genannte Vesikelfusion [64], nachdem der Objektträger mit der Goldschicht und der Monolage bereits in die Messzelle eingebaut ist. Vesikel sind Bläschen (mit ca. 50 nm Durchmesser), aus Lipiden. Treffen die Vesikel auf die Monolage, platzen sie auf und spreiten über die Monolage. Das Prinzip ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Hierfür

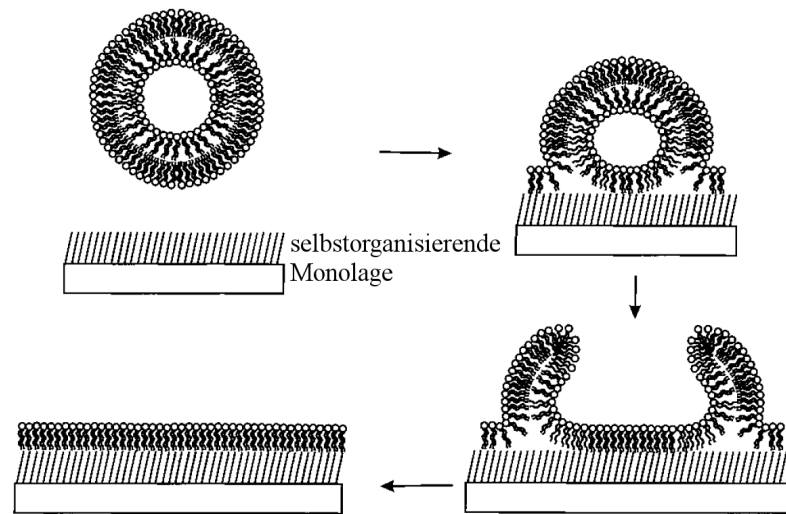


Abbildung 3.9: Vesikel-Fusion [64]

wurde eine Suspension von Lipiden (DPhyPC² von der Firma Avanti Polar Lipids in Pulverform) in einer Konzentration von 2 mg/ml in MilliQ-Wasser angesetzt. Da die Lipide in Wasser unlöslich sind, wurde die Mischung etwa eine Minute in einem Vortexer geschüttelt bis sich eine homogene Mischung bildete. In der Lösung liegen die Lipide in multilaminaren Vesikeln verschiedener Größen vor. In dieser Form sind sie allerdings nicht für eine Vesikelfusion geeignet, da sie sich nur zu einem geringen Teil mit der Monolage verbinden. Für eine homogene Doppellipidschicht haben sich unilamelare Vesikel mit einer Größe von 50 nm bis 100 nm bewährt [23]. Um diese herzustellen, wurde der Mini-Extruder (vgl. Abbildung 3.10) der Firma Avanti Polar Lipids verwendet. Hierbei wird die Lösung mit den multilamelaren Vesikeln mit Hilfe zweier Spritzen mehrfach durch eine poröse Polykarbonat-Membran gedrückt. In der vorliegenden Arbeit betrug die Porengröße 50 nm. Der Extrudier-Schritt wurde 21 Mal durchgeführt. Danach ist eine Vesikelgröße von 50 nm gewährleistet [25].

Für die Makroelektroden betrug das Volumen der Messzelle 1 ml, für die Mikroelektroden 3 ml. Für die Vesikelfusion wurden 25 μ l bzw. 75 μ l der Vesikel-Lösung in die Messzelle pipettiert, so dass sich eine Lipid-Konzentration von 0,05 mg/ml

²di-phytanoyl-glycero-phosphocholine

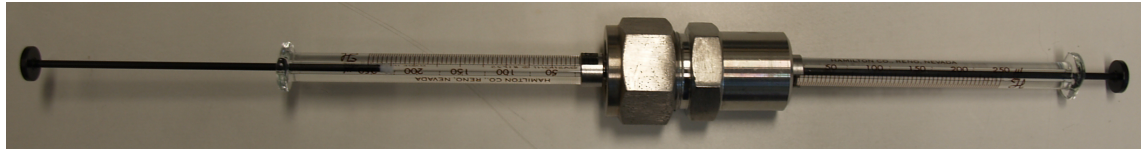


Abbildung 3.10: Extruder zur Herstellung von Vesikeln



Abbildung 3.11: Inneres des Extruders. Zu sehen ist die Polykarbonat-Membran mit einer Porengröße von 50 nm.

in den Messzellen ergab. Nach 24 Stunden wurde die Messzelle gespült, um eine Verfälschung des Messergebnisses durch nicht aufgeplatzte Vesikel, die sich an die Membran anlagern, zu vermeiden.

3.1.5 Integration von Ionophoren

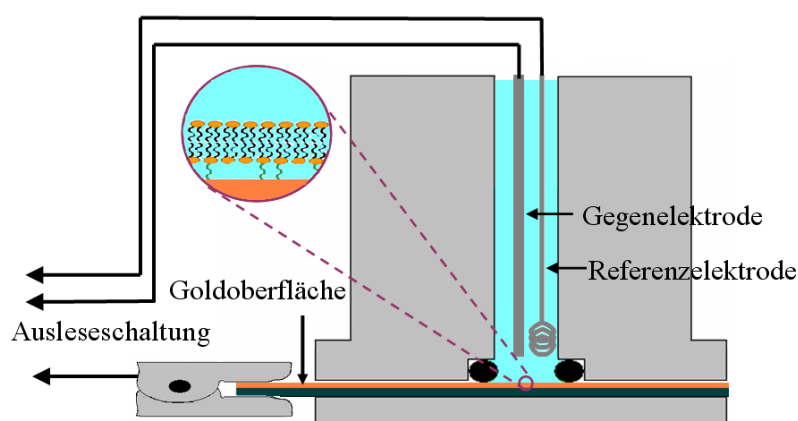


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Messanordnung für die Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Zur Beobachtung der Membran-Bildung auf der Sensorelektrode und der Einbettung des Valinomycins wurde die Elektrochemische Impedanzspektroskopie verwendet. Eine schematische Darstellung der Messanordnung ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Während der Bildung der Membran ist ein Anstieg des Membranwiderstandes R_M zu beobachten. Die Einbettung des Valinomycins bewirkt eine Verringerung des Membranwiderstandes R_M und eine Erhöhung der Spacerkapazität C_S . Die Veränderungen sind im elektrochemischen Impedanzspektrum beobachtbar. Durch einen Fit (mit dem Auswertungs- und Simulationsprogramm für Impedanzmessungen ZVIEW) der theoretischen Kurve an die Messdaten können die Werte der einzelnen Elemente im Ersatzschaltbild ermittelt werden.

So wird jeweils vor und nach jeder Änderung der Valinomycin-Konzentration eine EIS-Messung durchgeführt und anschließend an das Sensorsystem angeschlossen und

gemessen.

Da die Membran die Ionophore nur absorbiert und keine Desorption stattfindet, würden nach einiger Zeit die Ionophore vollständig von der Membran absorbiert werden. Bei einer hohen Valinomycin-Konzentration würde der Sensor also in Sättigung gehen. Die Anzahl der absorbierten Ionophore wäre in diesem Fall kein Maß für die Ionophor-Konzentration in der Messlösung. Um dieses Problem zu umgehen, wird die Messung immer nach einer bestimmten Zeit (hier anderthalb Stunden) nach Pipettieren der Ionophore durchgeführt und anschließend durch Spülen die restlichen Ionophore entfernt.

3.2 Verifizierung des Sensorprinzips

Der erste Teil der Verifizierung des Sensorprinzips zeigt den Nachweis der Funktion des Sensorprinzips. Es soll gezeigt werden, dass die Spacerkapazität ein Maß für die Ionophorkonzentration in der Membran ist. Zur Vereinfachung wurde hier mit einer diskreten Ausleseschaltung und makroskopischen Elektroden gearbeitet. So konnten Anpassungen der Schaltung an die Eigenschaften der Membran im Forschungsprozess leichter realisiert werden.

Im zweiten Teil soll die Funktion der CMOS-basierten Ausleseschaltung auf einem CMOS-Chip gezeigt werden.

3.2.1 Diskrete Ausleseschaltung

Die diskrete Ausleseschaltung ist ein RC-Oszillator (vgl. Abbildung 3.13). Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Membranwiderstand R_M und der Elektrolytwiderstand R_E vernachlässigt werden können, da R_M sehr groß ist und R_E sehr klein. In diesem Fall ergibt sich für die Gesamtkapazität aus der Kapazität der Doppelschicht C_M und des Spacer C_S :

$$C_{ges} = \frac{C_S \cdot C_M}{C_S + C_M} \quad (3.1)$$

Diese Kapazität wird über den Widerstand in der Rückkopplungsschleife $R_{feedback}$ aufgeladen und wieder entladen. Die Erneuerung des Signals in jedem Zyklus wird mit Hilfe eines Dualkomparators, einem RS-Flip-Flop und anschließenden NANDs³ realisiert. Die beiden Komparatoren vergleichen die Eingangsspannung V_{in} mit den Umschaltpegeln V_{low} und V_{high} . Wird die obere Schwelle V_{high} überschritten, so wird das anschließende RS-Flip-Flop gesetzt. Wird die untere Schwelle V_{low} unterschritten, so wird das RS-Flip-Flop gelöscht. Durch das anschließende NAND wird das Signal jeweils negiert. Das Ausgangssignal ist eine Rechteckspannung, deren Frequenz von der Kapazität C_{ges} und dem Widerstand $R_{feedback}$ abhängt. Sind der Membranwiderstand R_M und $R_{feedback}$ bekannt, so kann die Spacerkapazität C_S über die Frequenz f bestimmt werden. Zur Veranschaulichung der Funktionsweise der Schaltung zeigt Abbildung 3.14 den zeitlichen Verlauf der Eingangsspannung V_{in} und der Ausgangsspannung V_{out} . Da sich der Prozess immer nur am Beginn der Auf- und Entladekurve befindet, ist an V_{in} eine Dreiecksspannung zu beobachten und nicht wie erwartet als typische Auf- und Entladekurve eines Kondensators.

3.2.1.1 Messaufbau und Test

Der Messaufbau (vgl. Abbildung 3.15 und 3.16) besteht aus der Messzelle mit der Doppellipidschicht, der Platine mit der Ausleseschaltung, einer 30 V Spannungsquelle und vorerst einem Oszilloskop zur Auswertung des Ausgangssignals. Die Verwendung eines Oszilloskops ermöglicht die Untersuchung der Form der Ausgangsspannung. Ist sichergestellt, dass die Ausgangsspannung die Form eines Rechtecksignals konstanter Amplitude besitzt, so kann ein Frequenzzähler zur Messung der Frequenz eingesetzt werden.

Die Elektrode, auf dem sich die Membran befindet, wurde an die mittlere Versorgungsspannung gelegt und die Elektrode im Elektrolyten an den Eingangsknoten der Schaltung.

Zur Verifizierung des Sensorprinzips werden die Doppellipidschichten nach der Cha-

³”not and”

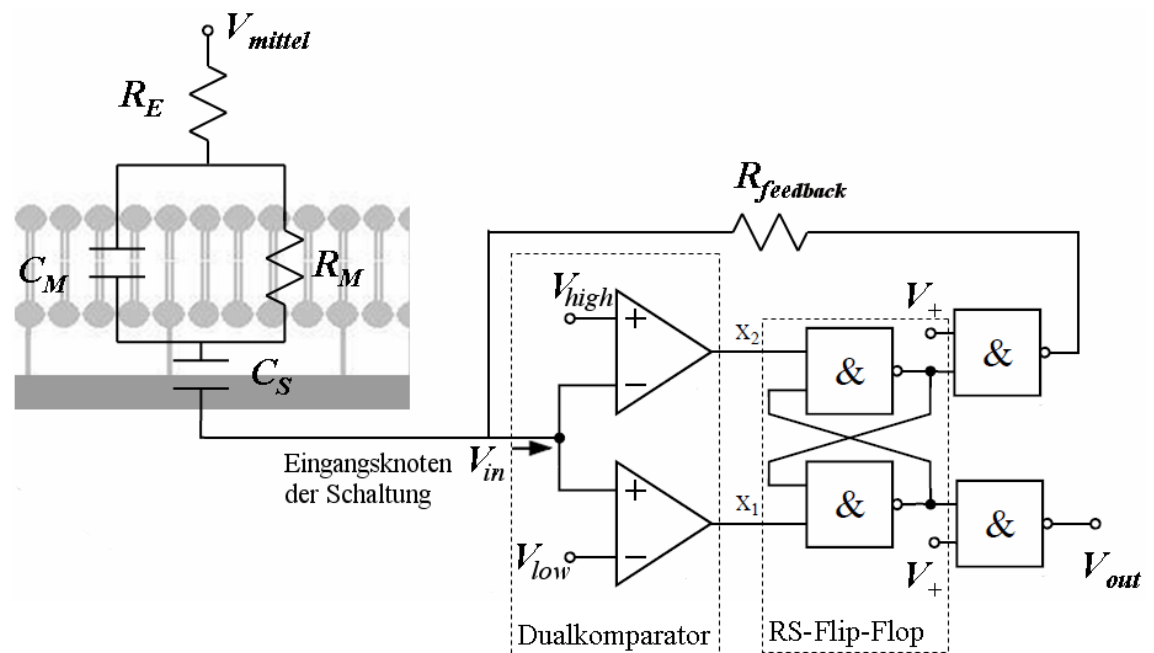


Abbildung 3.13: diskrete Ausleseschaltung

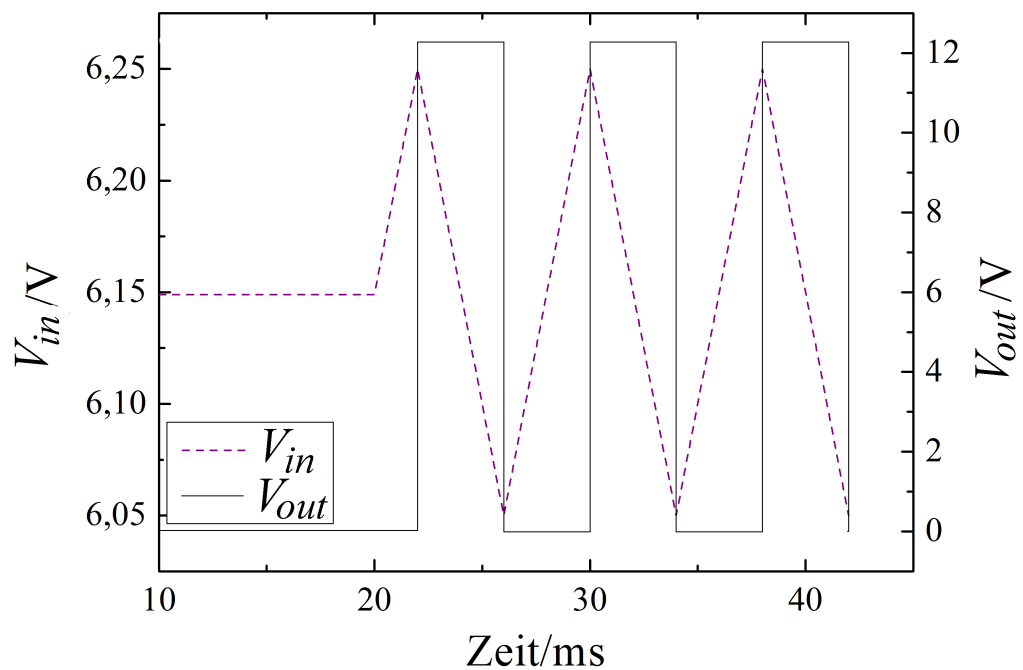


Abbildung 3.14: Signalverlauf der Eingangs- und der Ausgangsspannung

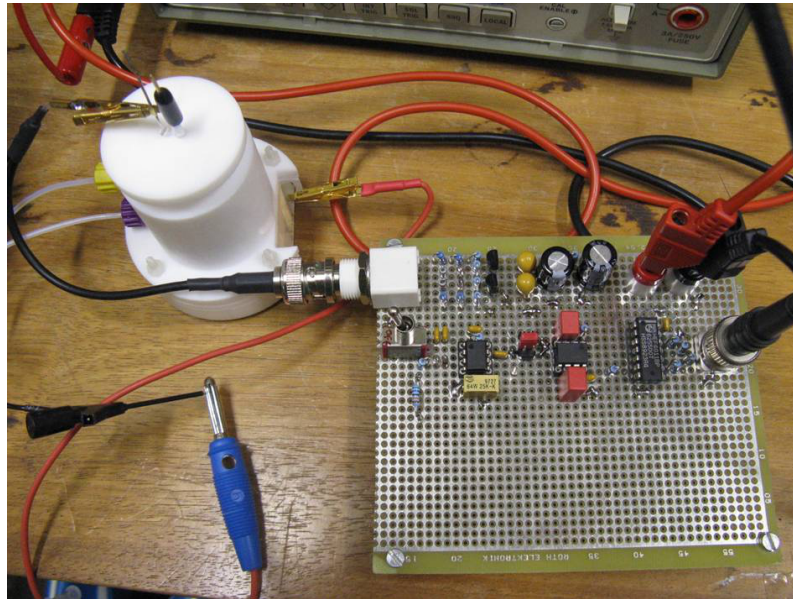


Abbildung 3.15: Messaufbau für die diskrete Ausleseschaltung. Links im Bild die Messzelle mit Membran und Elektroden. Rechts: Platine mit Ausleseschaltung.

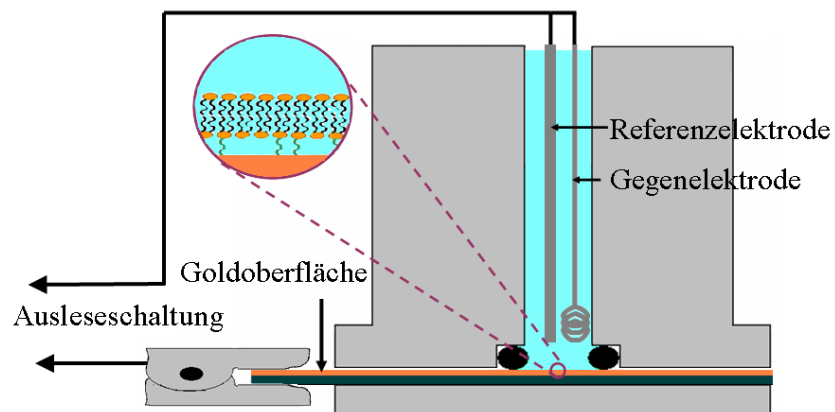


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Messanordnung für die Sensormessungen mit der diskreten Ausleseschaltung.

rakterisierung an die Sensor-Ausleseschaltung angekoppelt und die Messwerte aufgenommen. Zusätzlich wird die Schaltung zum Vergleich mit dem Simulationsprogramm LTspice [65] simuliert. Hierfür werden die aus den EIS-Messungen bestimmten Werte aus 4.2.1.1 für die Elemente des Ersatzschaltbildes der Membran in die Simulation eingebunden und damit das Ausgangssignal simuliert. Der Widerstand $R_{feedback}$ betrug 500 k Ω .

3.2.2 CMOS-Ausleseschaltung

Für die Miniaturisierung und Integration der Ausleseschaltung auf einem Chip wurde ein anderer Ansatz als für den Proof-of-Concept mit der diskreten Schaltung gewählt. Der Grund hierfür ist die Kernkompetenz des IMS im Bereich der "Switched-Capacitor"-Schaltungen. Ein Vorteil der "Switched-Capacitor"-Schaltungen gegenüber Schaltungen, bei denen Widerstände eingesetzt werden, liegt in der Möglichkeit, das Kapazitätsverhältnis genau einstellen zu können. Darüberhinaus bietet die Schaltung eine Platzeinsparung, da Widerstände in CMOS-Schaltungen eine größere räumliche Ausdehnung haben. Die CMOS-Ausleseschaltung wurde daher auf der Grundlage der "Switched-Capacitor"-Schaltungen entwickelt [66]. Die veränderlichen Größen bei Integration der Ionophoren sind der Membranwiderstand R_M und die Kapazität der elektrischen Doppelschicht und des Spacers C_S (Abbildung 3.17, linker Teil).

Das Kernstück der Ausleseschaltung ist ein Integratorblock, der die Ladung der Gesamtkapazität $C_{ges} = \frac{C_S \cdot C_M}{C_S + C_M}$ aufintegriert, verstärkt und als Spannung V_{out} ausgibt (Abbildung 3.17, rechter Teil).

Mit V_{out} kann die Ladungsbilanz berechnet werden (vgl. Abbildung 3.17). Hierbei ist Q die Ladung, die auf den Kondensatoren gespeichert ist.

Für die Phase Φ ergibt sich

$$Q_\Phi = C_{ges}(V_{mittel} - V_{mittel}) + C_i(V_{OS} - V_{mittel}) \quad (3.2)$$

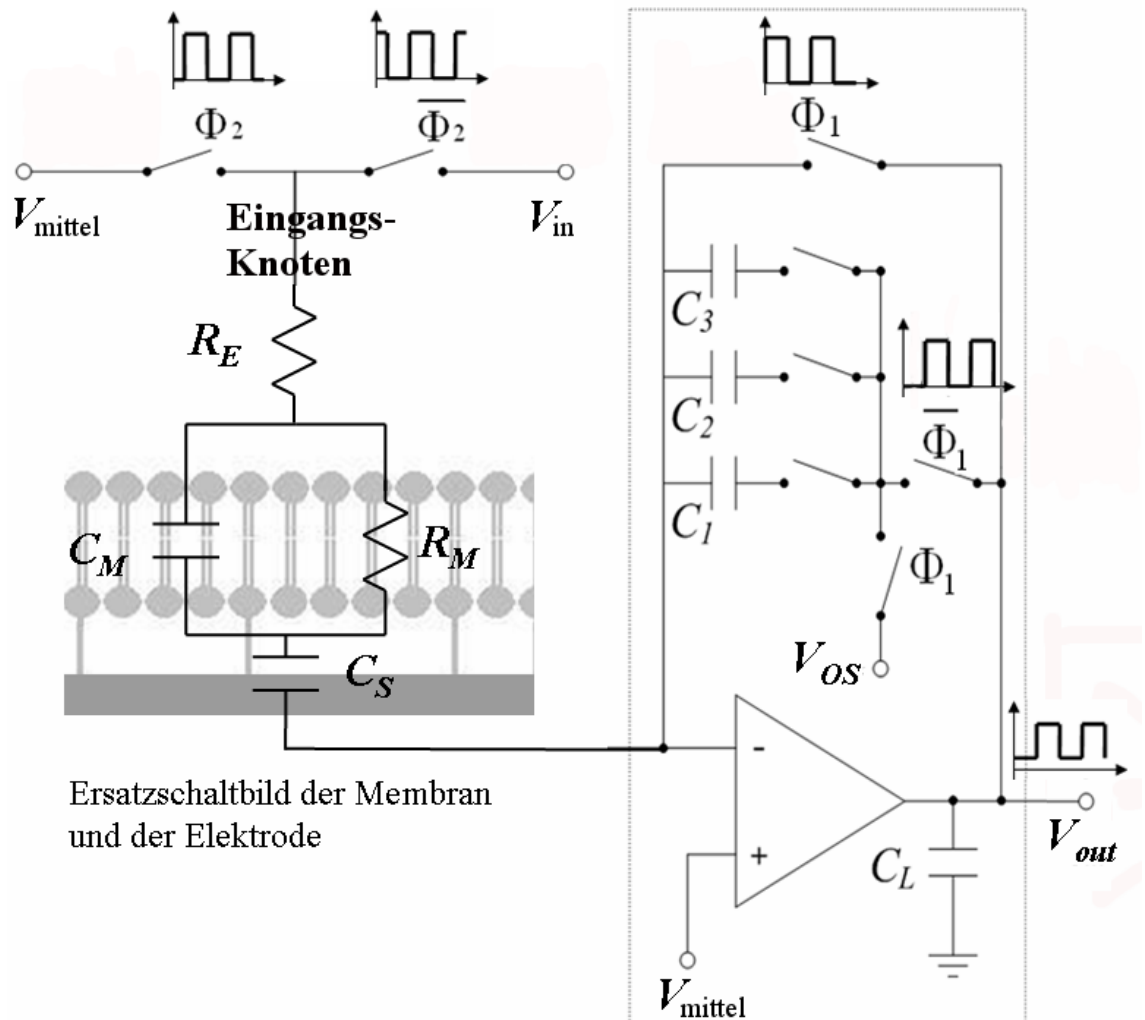


Abbildung 3.17: Ersatzschaltbild der Biomembran/Sensoroberfläche und der Ausleseschaltung. Ein programmierbares Array mit drei Kondensatoren in der Rückkopplungsschleife ermöglicht eine Anpassung an die Doppelschicht/Spacer-Kapazität C_S .

und für $\bar{\Phi}$ ergibt sich

$$Q_{\bar{\Phi}} = C_{ges}(V_{in} - V_{mittel}) + C_i(V_{out} - V_{mittel}). \quad (3.3)$$

Zum Zeitpunkt des Auslesens und im Resetzustand befindet sich das System in einem quasistatischen Zustand. Es fließen daher keine Ladungen. Mit $Q_{\Phi} = Q_{\bar{\Phi}}$ ergibt sich für die Ausgangsspannung

$$V_{out} = V_{OS} - \frac{C_{ges}}{C_i} \cdot \Delta V, \quad (3.4)$$

mit $\Delta V = V_{in} - V_{mittel}$. Höhere Spannungen ΔV von über 0,5 V können die Membran schädigen und sollten daher vermieden werden. Schädigungen sind elektrochemische Veränderungen der Membran, z.B. die Oxidation der Ankermoleküle. [24]

Um kurzzeitige, durch Schaltvorgänge verursachte, Spannungsabfälle von mehr als 0,5 V über der Membran zu vermeiden, wird der Eingangsknoten bei Änderung des Potentials kurzzeitig offen gelassen. Dies wird über die Unterteilung in die Phasen Φ_1 und Φ_2 , b.z.w. $\bar{\Phi}_1$ und $\bar{\Phi}_2$ erreicht. Das Taktschema mit den Zeiten t1 bis t6 in Abbildung 3.18 verdeutlicht den Ablauf.

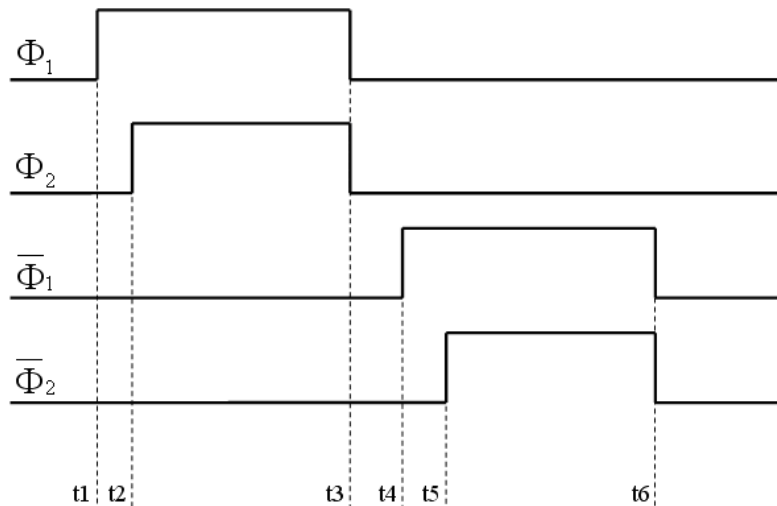


Abbildung 3.18: Taktschema der Sensoransteuerung

- t1:** Φ_1 : Durch Aktivieren der Schalter der Phase Φ_1 wird der Operationsverstärker des Integratorblocks in Einsverstärkung betrieben und die Kapazitäten in der Rückkopplungsschleife werden auf V_{OS} vorgeladen. Noch ist der Eingangsknoten spannungsmäßig nicht definiert.
- t2:** Φ_2 : Der Eingangsknoten wird auf V_{mittel} und damit die Spannung über C_{ges} auf 0 V gesetzt.
- t3:** Die Resetphase ist beendet. Es beginnt die Nicht-Überlappung vor der Integrationsphase. Alle Schalter sind geöffnet.
- t4:** $\overline{\Phi}_1$: Durch Aktivieren des Schalters $\overline{\Phi}_1$ wird die Kapazität in der Rückkopplungsschleife entladen. Der Eingangsknoten ist spannungsmäßig nicht definiert.
- t5:** $\overline{\Phi}_2$: Der Eingangsknoten wird auf V_{in} geladen. Damit fällt über der Membran ΔV ab. Je nach Kapazitätsverhältnis von C_{ges} und C_i stellt sich die Ausgangsspannung V_{out} ein und wird ausgelesen.
- t6:** Nichtüberlappung vor der Resetphase.

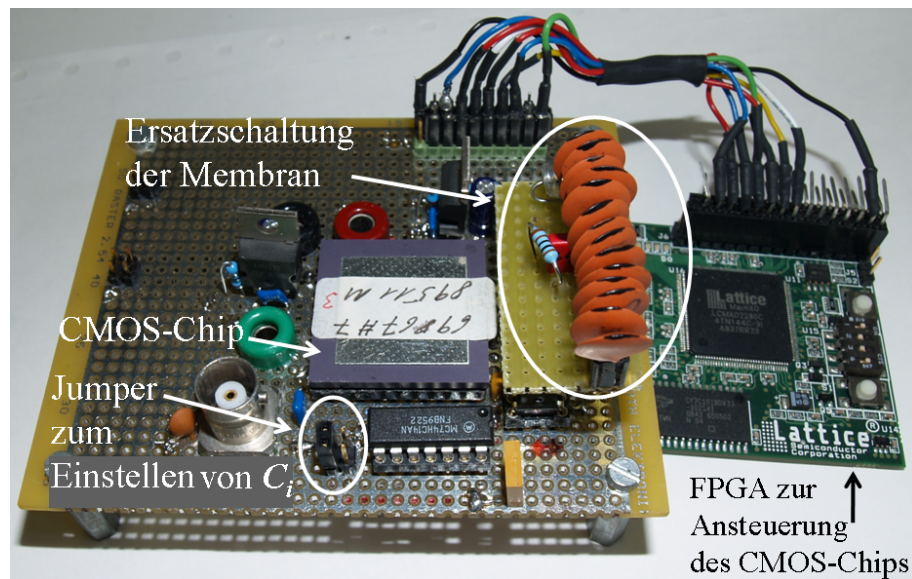
3.2.2.1 Simulation

In Formel 3.4 zur Berechnung der Ausgangsspannung wird nicht berücksichtigt, dass es neben den Kapazitäten C_{ges} und C_i weitere parasitäre Kapazitäten gibt, die z.B. durch die Kontaktpads entstehen. Um dies zu erfassen und um zusätzlich einen ersten Eindruck von der Sensitivität des Sensors zu bekommen, wird die Ausleseschaltung mit dem Programm "Spectre Circuit Simulator" (Cadence®) simuliert. Hierfür ist es notwendig, das Ersatzschaltbild für die Membran und die Sensoroberfläche mit einzubeziehen, welches in Abschnitt 2.3 diskutiert wurde.

Um die Parameter R_M , C_M , R_E und C_S zu bestimmen, wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ingo Köper vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung begonnen. Es wurden elektrochemische Impedanzspektren in Abhängigkeit

3.2.2.2 Messaufbau und Test

Die Generierung der Takte Φ_1 und Φ_2 , $\overline{\Phi}_1$ und $\overline{\Phi}_2$ erfolgt über ein FPGA⁴ (MachXo



Mini Developmet Kit - Board der Firma Lattice).

⁴Field Programmable Gate Array

Da für den Chip ein High-Signal von 5 V nötig ist und das FPGA nur 3,3 V liefert, wurden die Spannungen der Signale durch den Schmitt-Trigger-Inverter 74HCT14 von Phillips Semiconductors auf 5 V erhöht. Um in der Forschungsphase möglichst flexibel zu sein, werden die Schalter für die Phasen Φ_2 und $\overline{\Phi}_2$ nicht in den CMOS-Chip integriert. Sie werden auf einer Platine realisiert. Für diese Funktion wird der duale Analog-Schalter ADG436 der Firma Analog Devices eingesetzt.

Um nach der Fertigung den Sensorchip auf seine Funktionalität überprüfen zu können, wird das Ersatzschaltbild der Membran (vgl. Abbildung 2.21) mit diskreten Bauelementen auf einer Platine nachgebaut.

Verschiedene Kapazitäten C_S werden eingesetzt und die Ausgangsspannung mit einem Oszilloskop beobachtet und mit der Simulation verglichen.

3.2.2.3 Ankopplung der Membran an die Sensorschaltung

Zur Verifizierung des Messprinzips mit dem CMOS-Chip wird die Membran in der Messzelle an den Elektrodeneingang des Sensorchips angeschlossen und die Ausgangsspannung auf einem Oszilloskop beobachtet. Das Peptid Valinomycin wird der Messlösung hinzugegeben und die Änderung der Ausgangsspannung gemessen. Zum Vergleich werden Elektrochemische Impedanzspektren aufgenommen. Wie bei der diskreten Ausleseschaltung werden auch hier die Werte für die Kapazität aus dem Fit extrahiert.

Der Messaufbau ist in Abbildung 3.21 dargestellt, eine schematische Darstellung der Messanordnung der Messzelle ist in Abbildung 3.20 gezeigt.

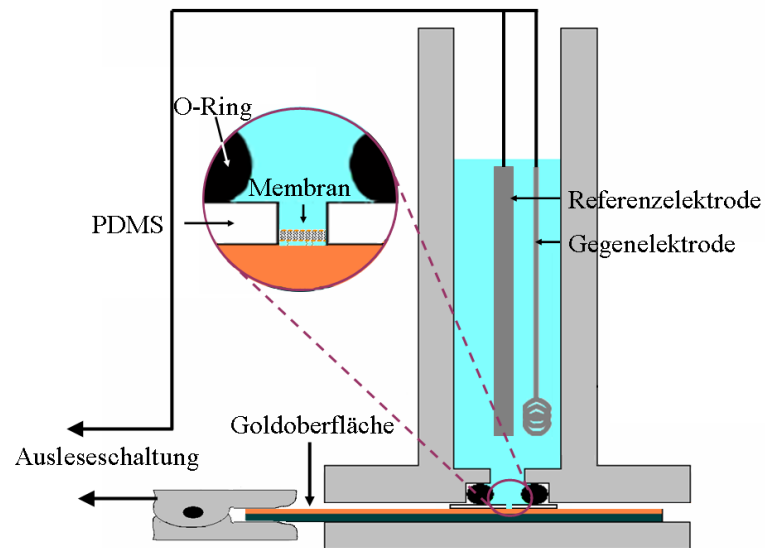


Abbildung 3.20: Skizze der Messzelle für die Sensormessung mit der integrierten CMOS-Schaltung.

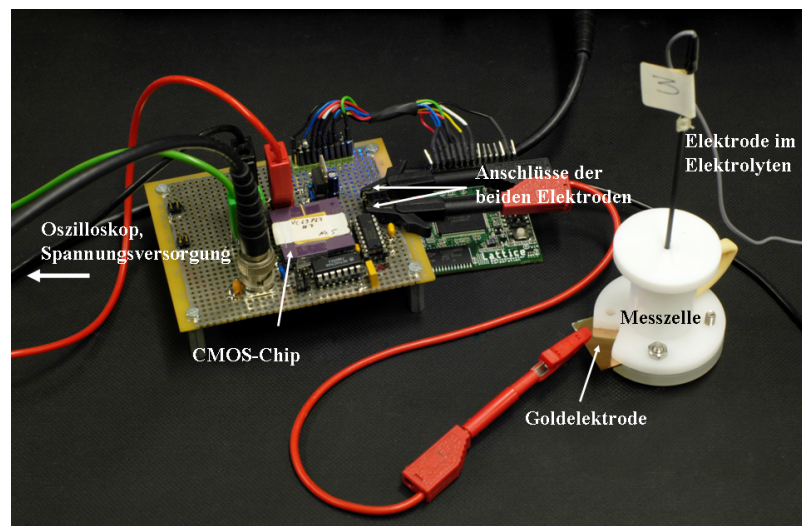


Abbildung 3.21: Messaufbau für die CMOS-Sensormessung. Gezeigt ist die Platine mit dem CMOS-Chip und die Messzelle mit der Membran auf der Goldelektrode.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung der Membran

4.1.1 Rauheit der Goldelektroden

Abbildung 4.1 zeigt eine AFM-Messung einer mit dem TSG-Verfahren hergestellten Goldelektrode. Die mittlere Rauheit über dem Abtastbereich beträgt $3,92 \text{ \AA} (\pm 1,07 \text{ \AA})$ in einem Abtastbereich von $10 \mu\text{m}$ und liegt damit im Bereich der Rauheit des blanken Silizium-Wafers, die ebenfalls mit einem AFM zu $3,47 \text{ \AA} (\pm 0,78 \text{ \AA})$ bestimmt wurde. Die benötigte glatte Oberfläche, um eine geeignete Membran zu fertigen, ist damit erreicht.

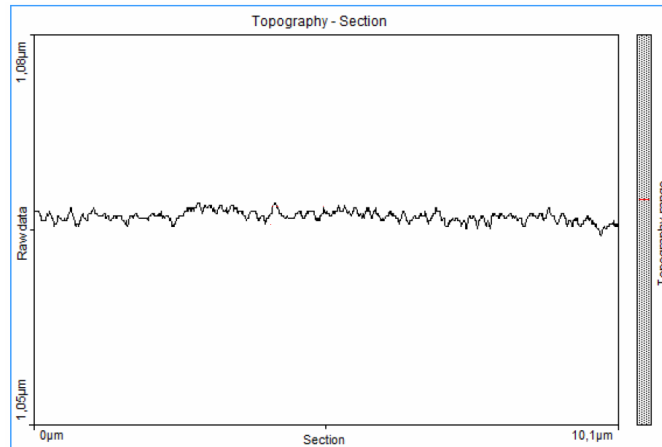


Abbildung 4.1: AFM-Messung zur Ermittlung der Rauheit einer mit dem TSG-Verfahren hergestellten Goldschicht. Die gemittelte Rauheit beträgt $3,92 \text{ \AA}$.

4.1.2 Mikroelektroden

Abbildung 4.2 zeigt die Öffnung der PDMS-Maske über einer Goldschicht. Es ist eine scharf abgegrenzte Linie auf der Oberfläche zu erkennen. Das PDMS liegt auf der Oberfläche gleichmäßig auf. Dadurch wird gewährleistet, dass das PDMS den Rand der Elektrode isoliert.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Ströme durch die $100 \mu\text{m}$ dünne PDMS-Schicht verursacht werden, müssen der Widerstand R_{PDMS} und die Kapazität C_{PDMS} der PDMS-Schicht berechnet werden. Das Ersatzschaltbild der Doppellipidschicht unter Berücksichtigung der PDMS-Maske ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Der spezifische Widerstand und die relative Permittivität von PDMS sind in der Literatur mit $\rho_{PDMS}=10^{15} \Omega\text{cm}$ und $\epsilon_{r,PDMS}=2,7$ angegeben [67]. Damit ergeben sich für die PDMS-Schicht eine Kapazität von $C_{PDMS} = 234,28 \text{ fF}$ und $R_{PDMS}=5 \text{ T}\Omega$. Da C_{PDMS} klein im Verhältnis zu den Kapazitäten der Doppellipidschicht C_M und des Spacers C_S (im Nanofaradbereich) ist und die Kapazitäten während der Messung parallel geschaltet sind, ist C_{PDMS} zu vernachlässigen. R_{PDMS} ist um mehrere Zehnerpotenzen größer als R_M . Damit kann ein signifikanter Einfluss der PDMS-Maske

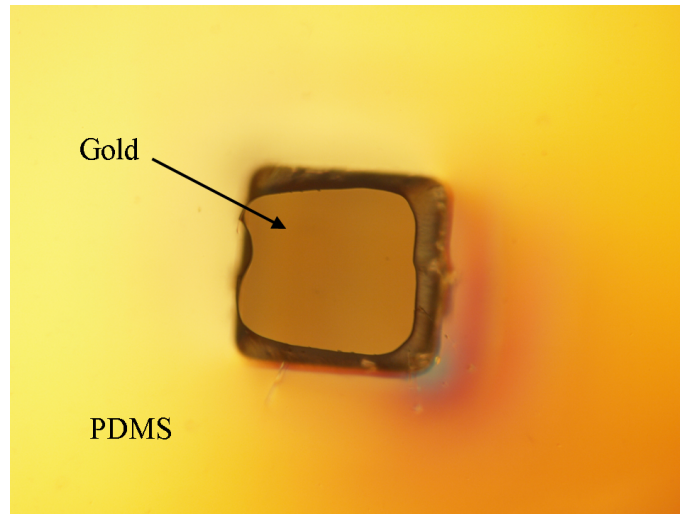


Abbildung 4.2: PDMS-Maske auf einer Goldschicht

auf das Messergebnis ausgeschlossen werden.

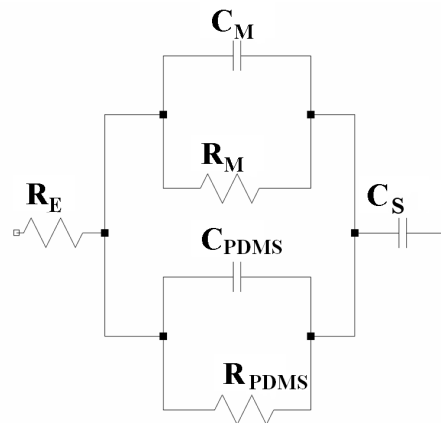


Abbildung 4.3: Ersatzschaltbild der Doppellipidschicht für den Messaufbau der CMOS-Schaltung unter Berücksichtigung der PDMS-Maske

4.1.3 Von der Monolage zur Doppellipidschicht

Kontaktwinkelmessungen wurden für den Nachweis der Monolage auf dem Substrat genutzt. Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen jeweils Kontaktwinkelmessungen der

DPHT-Monolage bzw. der DPTL-Monolage. Zu erkennen sind jeweils $5\,\mu\text{l}$ Wassertropfen auf den Monolagen. Die Linien sind die Tangenten an dem Tropfenumriss am Berührungspunkt zwischen Tropfen und Substrat.

Für DPHT wurde der Kontaktwinkel zu $\alpha=94^\circ$ bestimmt und für DPTL zu $\alpha=92^\circ$. Dies ist geringer als in der Literatur genannte Werte für optimale Kontaktwinkel zur Membranbildung. Die Ursache für einen geringeren Kontaktwinkel ist durch eine geringere Bedeckung der Oberfläche mit Membranmolekülen bedingt. Dies entsteht beispielsweise durch Unebenheiten auf der Goldoberfläche.

Da die Oberfläche aber dennoch hydrophob ist, ist der Nachweis erbracht, dass sich eine Monolage ausgebildet hat (vgl. Abschnitt 3.1.2). Daher wurde im Anschluss der Messung mit der Vesikelfusion begonnen.

Die Bildung der Doppellipidschichten für die DPTL- und die DPHT-Membran sind

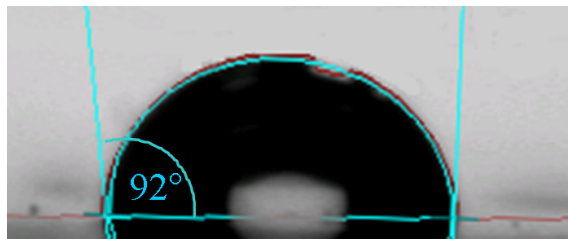


Abbildung 4.4: Kontaktwinkelmessungen der DPHT-Monolage

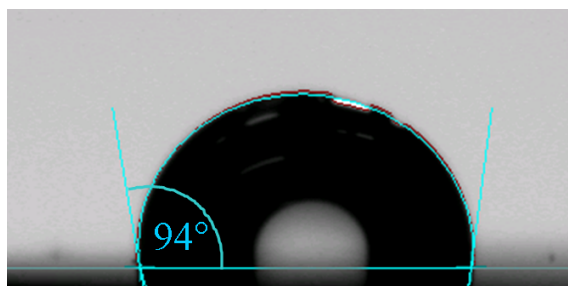


Abbildung 4.5: Kontaktwinkelmessung der DPTL-Monolage

in den Abbildungen 4.6 und 4.7 anhand der dazugehörigen Impedanzspektren gezeigt. Die Messdaten sind im Bode-Plot als Punkte dargestellt und die theoretische mit dem Simulations- und Auswertprogramm ZVIEW ermittelte Anpassungskurve

als durchgezogene Linien. Die Ergebnisse aus der theoretischen Anpassung sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Für den spezifischen Membranwiderstand ρ_M , *Lit* ist in der Literatur ein Bereich

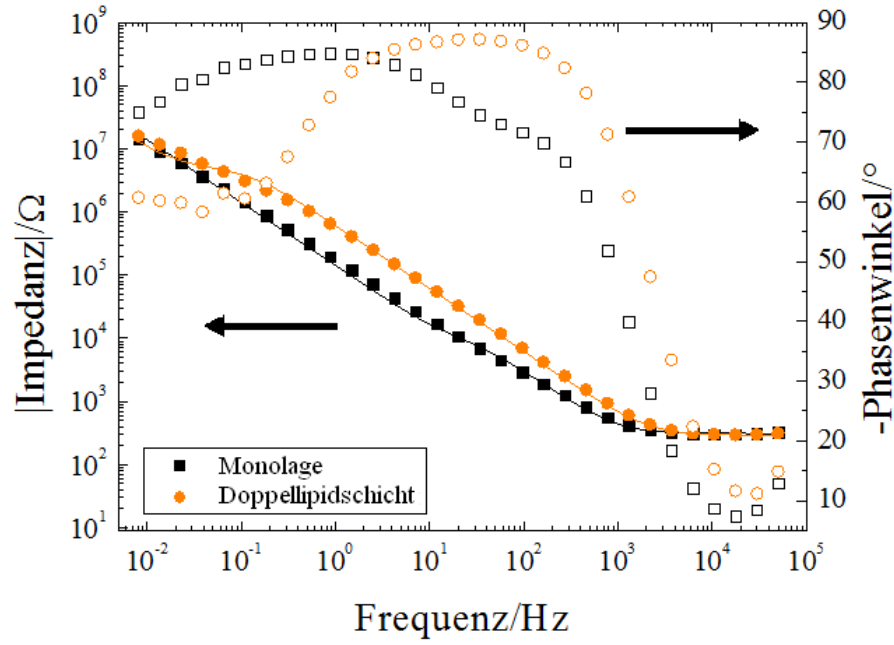


Abbildung 4.6: Bildung der DPHT-Membran. Gezeigt sind die Impedanzspektren der Monolage und der Doppellipidschicht.

	$\rho_M/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	$\xi_M/\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Monolayer	$1,53 \pm 0,43$	$3,52 \pm 0,04$
Bilayer	$1191,43 \pm 158,46$	$1,09 \pm 0,64$

Tabelle 4.1: Aus der Anpassung bestimmte Werte für ρ_M und ξ_M der DPHT-Membran

von $3\text{--}55\text{ M}\Omega\text{cm}^2$ angegeben [24]. Mit $16,5\text{ k}\Omega\text{cm}^2$ liegt ρ_M für die in dieser Arbeit verwendeten DPTL-Membran weit darunter. Der geringe Membranwiderstand kann auf den geringen Kontaktwinkel zurück geführt werden. Geringe Kontaktwinkel gehen mit einem geringen Bedeckungsgrad der Selbstorganisierenden Monolage einher.

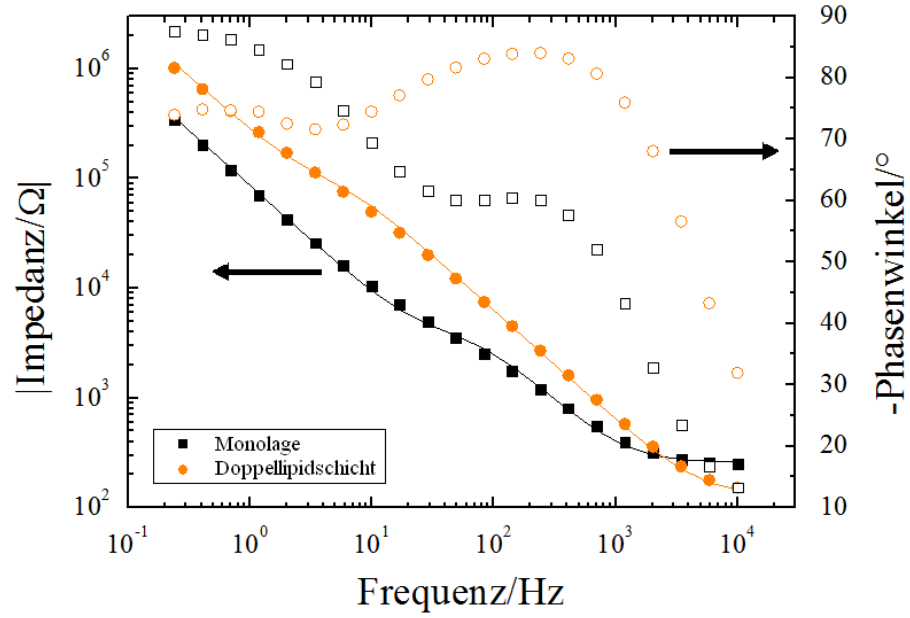


Abbildung 4.7: Bildung der DPTL-Membran. Gezeigt sind die Impedanzspektren der Monolage und der Doppellipidschicht.

	$\rho_M/\Omega\text{cm}^2$	$\xi_M/\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Monolayer	$764,1 \pm 54,6$	$2,74 \pm 0,17$
Bilayer	16469 ± 1877	$1,56 \pm 0,69$

Tabelle 4.2: Aus der Anpassung bestimmte Werte für ρ_M und ξ_M der DPTL-Membran

Ist der Bedeckungsgrad der Monolage zu niedrig, so kann keine dichte Doppellipidschicht ausgebildet werden. Mögliche Ursachen hierfür sind Unregelmäßigkeiten auf der Oberfläche der Goldschicht. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich durch einen Alterungsprozess die Spacermoleküle vom Rest des DTPL-Moleküls gelöst haben (vgl. Abbildung 4.8). Dadurch wird die Bildung der Doppellipidschicht ebenfalls eingeschränkt. Mit dem niedrigen spezifischen Membranwiderstand ist auch eine höhere spezifische Membrankapazität $\xi_M = 1,56 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ verbunden. In der Literatur ist $\xi_{M,Lit}$ mit $0,6\text{--}1,1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ angegeben.

Für DPHT-Membranen beträgt der spezifische Widerstand ρ_M in der Literatur $2\text{--}35 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. ρ_M für die DPHT-Membran in dieser Arbeit liegt mit $1,19 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ etwas außerhalb dieses Bereiches. Auch die spezifische Membrankapazität $\xi_M = 1,09 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ weicht von dem in der Literatur angegebenen Bereich von $0,6\text{--}0,85 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ab. Diese Abweichungen sind jedoch im Vergleich zur DPTL-Membran gering.

Während des Prozesses der Vesikelfusion verringern sich die Membrankapazitäten

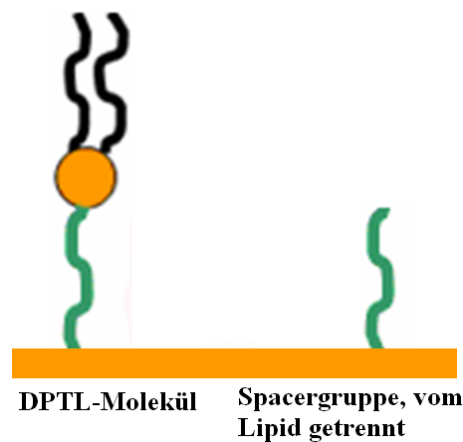


Abbildung 4.8: Durch einen Alterungsprozess kann es passieren, dass der Spacer vom Lipid getrennt wird.

der Doppellipidschichten und die Membranwiderstände erhöhen sich, da die Schichtdicke der Membran durch die Vesikelfusion zunimmt.

4.2 Verifizierung des Sensorprinzips

4.2.1 Diskrete Ausleseschaltung

4.2.1.1 Charakterisierung der Doppellipidschicht mittels EIS

Die Abbildungen 4.9 und 4.10 zeigen die Impedanzspektren der Membranen mit DPHT- und DPLT-Monolage bei Zugabe unterschiedlicher Valinomycin-Konzentrationen. Abweichungen der theoretischen Kurven von den gemessenen entstehen durch Inhomogenitäten der Membran und der Elektrodenoberfläche und Diffusionsprozesse im Elektrolyten.

Die spezifischen auf die Elektrodenfläche bezogenen Membranwiderstände ρ_M für die DPTL- und die DPHT-Membran sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Der Membranwiderstand sinkt mit zunehmender Valinomycinkonzentration, da das Valinomycin die passive Diffusion der Ionen durch die Membran erleichtert.

Die spezifischen auf die Elektrodenfläche bezogenen Werte für die Membrankapazität ξ_M und die Spacerkapazität ξ_S der DPTL- und der DPHT-Membran sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Valinomycin-Konzentration	$\rho_M/\text{k}\Omega\text{cm}^2$ DPHT	$\rho_M/\text{k}\Omega\text{cm}^2$ DPTL
Bilayer	1190±158	26±1,6
10 nM	949±123	8,1±0,6
20 nM	668±87	3,2±0,3
30 nM	578±75	2,8±0,2

Tabelle 4.3: Aus der Anpassung bestimmte Werte für ρ_M der DPHT- und der DPTL-Membran

Valinomycin-Konzentration	$\xi_M/\mu\text{F}/\text{cm}^2$ DPHT	$\xi_S/\mu\text{F}/\text{cm}^2$	$\xi_M/\mu\text{F}/\text{cm}^2$ DPTL	$\xi_S/\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Bilayer	$1,09\pm0,06$	$5,77\pm0,55$	$1,41\pm0,07$	$2,98\pm0,23$
10 nM	$1,10\pm0,07$	$6,40\pm0,60$	$1,42\pm0,10$	$3,37\pm0,17$
20 nM	$1,11\pm0,07$	$6,50\pm0,58$	$1,43\pm0,11$	$3,52\pm0,14$
30 nM	$1,11\pm0,07$	$7,45\pm0,69$	$1,42\pm0,10$	$3,71\pm0,18$

Tabelle 4.4: Aus der Anpassung bestimmte Werte für ξ_M und ξ_S der DPHT- und der DPTL-Membran

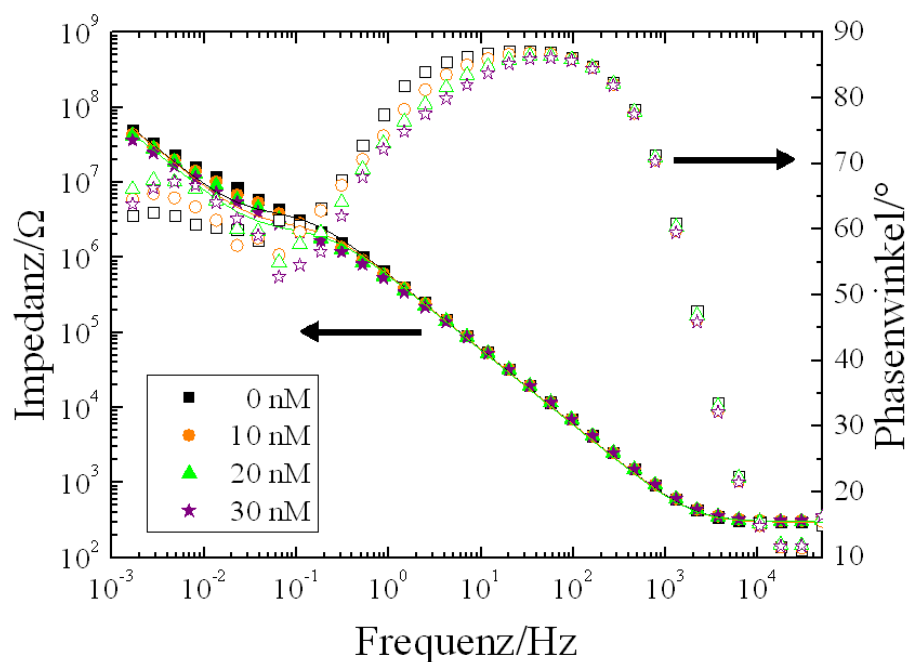


Abbildung 4.9: Impedanzspektren der Membran mit DPHT-Spacer bei Valinomycin-Konzentrationen der Messlösung von 0 nM, 10 nM, 20 nM und 30 nM

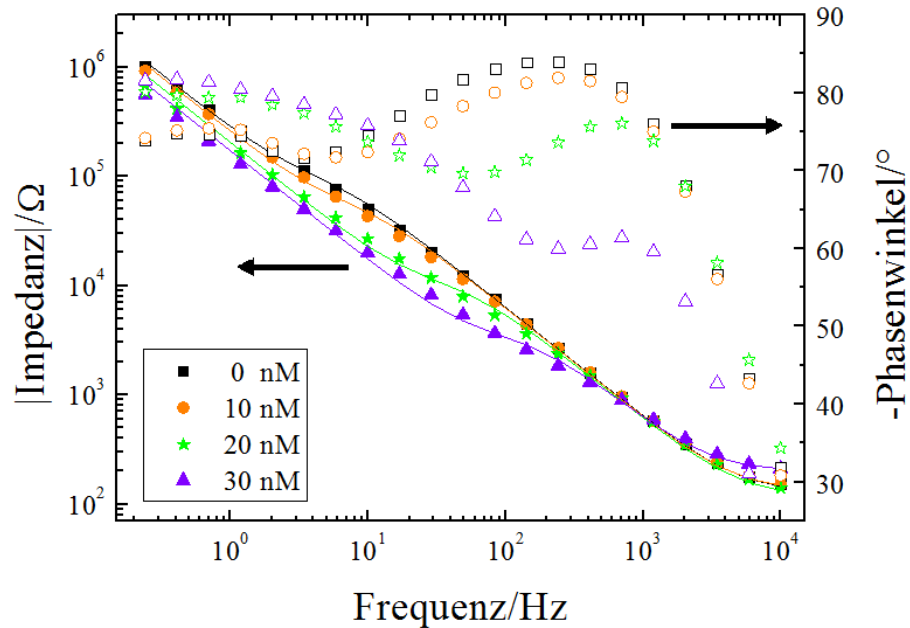


Abbildung 4.10: Impedanzspektren der Membran mit DPTL-Spacer bei Valinomycin-Konzentrationen der Messlösung von 0 nM, 10 nM, 20 nM und 30 nM

Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen die aus einer Anpassung mit dem Programm ZVIEW erhaltenen Werte für die Spacer-Kapazitäten C_S und die Kapazitäten der Doppellipidschichten C_M in Abhängigkeit der Valinomycin-Konzentration. C_M bleibt für beide Membranen, wie erwartet, nahezu konstant. Dies ist eine Möglichkeit, zu überprüfen, ob die Membran durch die Valinomycin-Lösung beschädigt wurde. Eine Erhöhung von C_M ist ein Hinweis auf eine eventuelle Beschädigung der Membran. Dies kann passieren, wenn der Abstand der Pipette mit der Ethanol-Valinomycin-Lösung und der Membran beim Einbringen des Valinomycins zu gering ist. Da die Lipide der Membran Ethanol-löslich sind, können sie in diesem Fall einfach weggespült werden. Die Membran wird dadurch dünner, was sich in einer Erhöhung von C_M zeigt.

C_S hingegen erhöht sich mit zunehmender Valinomycin-Konzentration (von 0 nM auf 30 nM) für die DPTL-Membran von $0,84 \mu\text{F}$ auf $1,05 \mu\text{F}$ und für die DPHT-Membran von $1,63 \mu\text{F}$ auf $2,11 \mu\text{F}$. Dies bedeutet eine prozentuale Erhöhung um 29% für die

DPHT-Membran und 19% für die DPTL-Membran. Auf die Fläche bezogen erhöht sich die spezifische Spacerkapazität ξ_S der DPTL-Membran von $3,01 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $3,75 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ und der DPHT-Membran von $5,82 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $7,54 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Die Spacerkapazität der DPHT-Membranen ist größer als die der DPTL-Membran. Begründet werden kann dies durch den längeren Spacer der DPHT-Membranen (die DPHT-Membran beinhaltet daher ein größeres Ionenreservoir) (vgl. Abschnitt 2.1.1) [24].

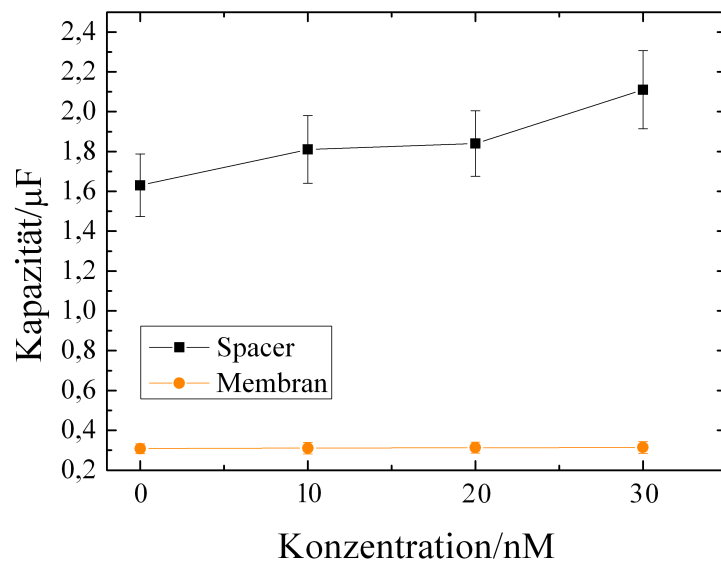


Abbildung 4.11: DPHT-Membran: Spacerkapazität in Abhängigkeit der Valinomycin-Konzentration

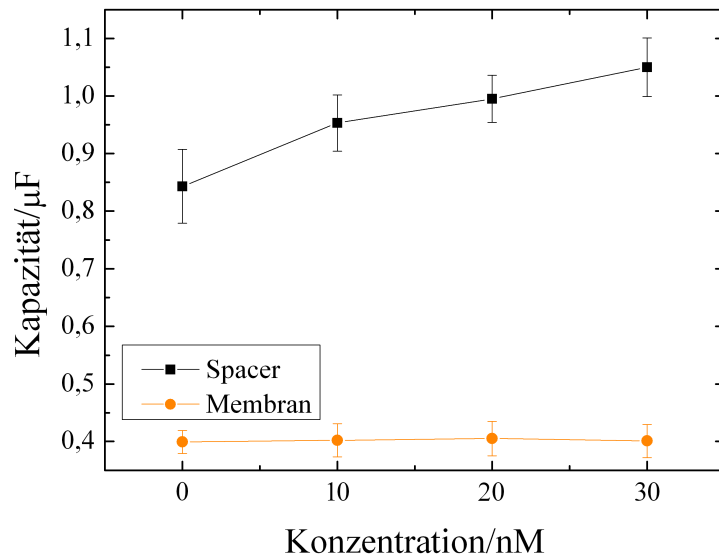


Abbildung 4.12: DPTL-Membran: Spacerkapazität in Abhängigkeit der Valinomycin-Konzentration

4.2.1.2 Sensormessung und Simulation

Die Abbildungen 4.13 und 4.14 zeigen die Frequenz der Ausgangsspannung in Abhängigkeit der Valinomycin-Konzentration. Dargestellt sind die gemessenen Werte im Vergleich mit den Werten aus der Spice-Simulation. Diese wurde wie in 3.2.1.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei ist zu beobachten, dass die Frequenz mit zunehmender Valinomycin-Konzentration sinkt. Dies hängt damit zusammen, dass die Kapazität $C_{ges} = \frac{C_S \cdot C_M}{C_S + C_M}$ im RC-Oszillator mit zunehmender Valinomycin-Konzentration steigt (vgl. $\frac{1}{f} \sim R_{feedback} \cdot C_{ges}$). Die Mess- und Simulationsergebnisse der DPHT- und der DPTL-Membran sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Bei der DPHT-Membran weichen die gemessenen Werte stärker von den simulierten ab, zeigen aber die gleiche Tendenz und liegen in der gleichen Größenordnung. Abweichungen können dadurch erklärt werden, dass die Simulation auf idealen Bauelementen basiert. So werden beispielsweise parasitäre Kapazitäten nicht berücksichtigt.

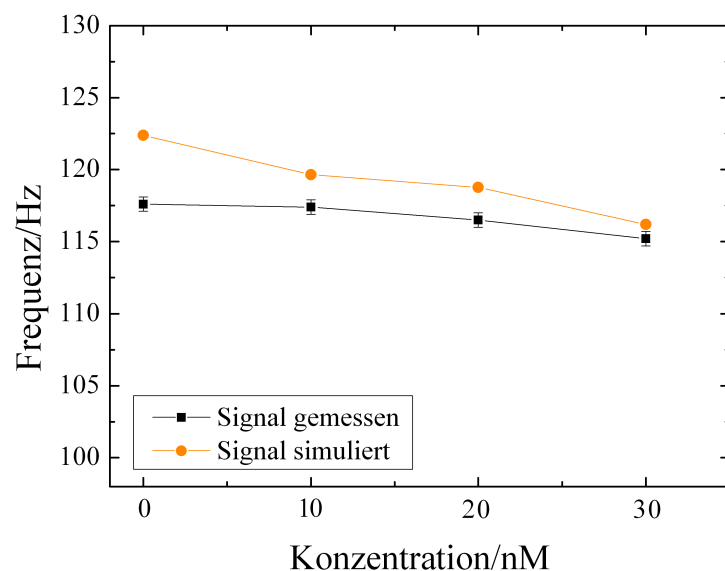


Abbildung 4.13: DPHT-Membran: Das Sensorsignal (die Frequenz) in Abhängigkeit der Valinomycin- Konzentration. Der Simulation liegen die aus 4.2.1.1 bestimmten Werte für die Elemente des Ersatzschaltbildes der Membran zugrunde.

Valinomycin-Konzentration	DPHT f/Hz gemessen	f/Hz simuliert	DPTL f/Hz gemessen	f/Hz simuliert
Bilayer	117,6±0,5	122,4	111,2±0,5	108,4
10 nM	117,4±0,5	119,6	109,5±0,5	107,8
20 nM	116,5±0,5	118,8	105,4±0,5	105,1
30 nM	115,2±0,5	116,2	101,0±0,5	100,6

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Sensormessungen mit der DPHT- und der DPTL-Membran

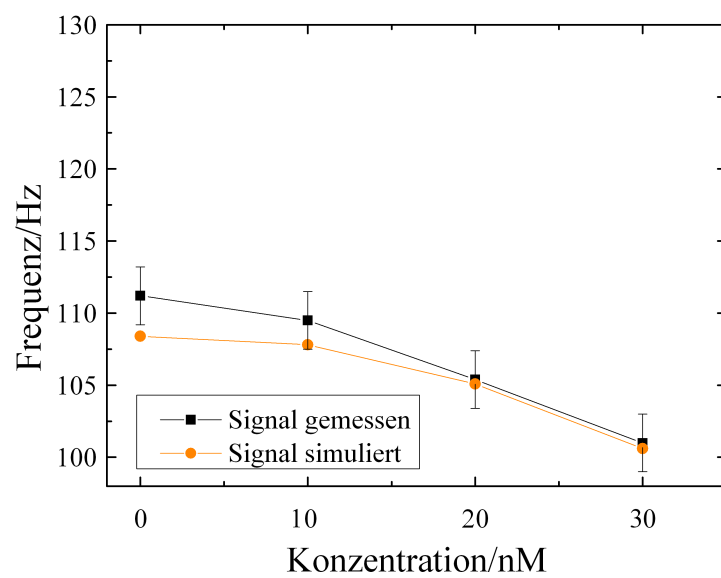


Abbildung 4.14: DPTL-Membran: Das Sensorsignal (die Frequenz) in Abhängigkeit der Valinomycin- Konzentration. Der Simulation liegen die aus 4.2.1.1 bestimmten Werte für die Elemente des Ersatzschaltbildes der Membran zugrunde.

Die gemessene Änderung der Frequenz bei der DPTL-Membran ist größer als die der DPHT-Membran, obwohl die Kapazitätsänderung der DPHT-Membran größer ist. Aus dem Impedanzspektrum ist abzulesen, dass der Widerstand der DPTL-Membran mit ca. $90\text{ k}\Omega$ sehr klein ist. Bei der 30 nM Konzentration beträgt er nur noch $9,9\text{ k}\Omega$. Bei zu kleinem R_M ist die Ausleseschaltung ebenfalls abhängig von R_M . Ein Teil der Signaländerung wird daher auch durch die Widerstandsänderung verursacht. Die Abhängigkeit der Ausleseschaltung von R_M ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

Trotz der leichten Abweichungen zwischen Simulation und Messung konnte ein

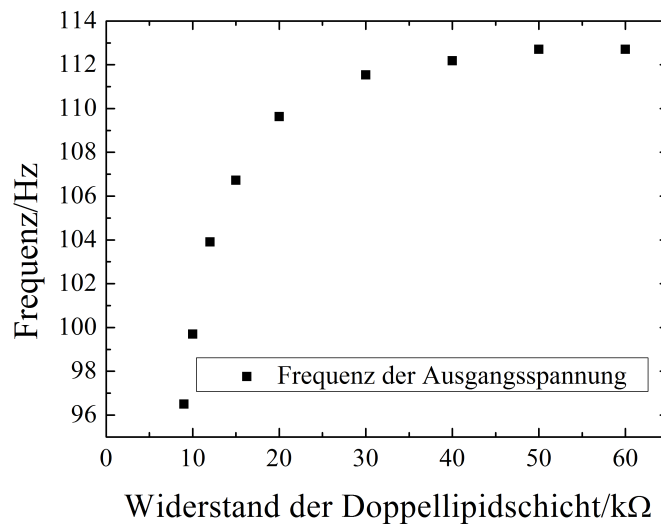


Abbildung 4.15: Abhängigkeit der Frequenz der Ausgangsspannung von dem Widerstand der Doppellipidschicht

Zusammenhang zwischen Valinomycin-Konzentration und dem Sensorauslese-Signal gezeigt werden. Es ist gelungen, die Spacerkapazität C_S als Transduktionssignal für die Valinomycin-Konzentration messtechnisch umzusetzen. Damit wurde das Sensorprinzip verifiziert. Es konnte eine Valinomycin-Konzentration von min. 10 nM nachgewiesen werden.

Ein grundsätzliches Problem bei der Präparation der Doppellipidschichten mit verschiedenen Valinomycin-Konzentrationen ist damit verbunden, dass das Valinomy-

cin in Ethanol gelöst ist. Da die Lipide der Membran ebenfalls in Ethanol löslich sind, kann das Ethanol, das der Messlösung hinzugefügt wird, die Membran lokal auflösen. Es werden zwar immer nur geringe Mengen an Ethanol der Messlösung hinzugefügt, allerdings muss die Valinomycin-Ethanol-Lösung nah an die Membran herangebracht werden, damit das Valinomycin seine Ethanol-Hülle nicht verliert und somit die Gefahr besteht, dass es denaturiert. Beim Denaturieren fällt das Valinomycin aus und bildet weiße Flocken, die mit bloßem Auge sichtbar sind.

Wird die Membran durch das Ethanol angegriffen, so wird die Membran dünner. Die Lipide werden weggespült. Dies lässt sich in einer Verringerung der Membrankapazität beobachten. Dieser Prozess ist in den meisten Fällen reversibel, da sich die Lipide in der Membran frei bewegen können und kleinere Defekte innerhalb von einigen Stunden wieder ausgleichen.

4.2.2 CMOS-Ausleseschaltung

4.2.2.1 Simulation

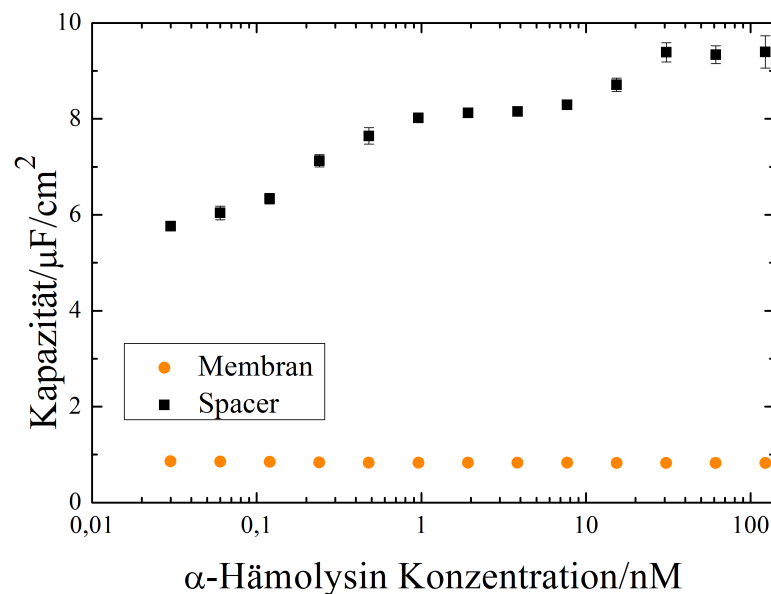


Abbildung 4.16: Kapazität in Abhängigkeit der α -Hämolysin-Konzentration. Die Kapazitätswerte wurden mit Elektrochemischer Impedanzspektroskopie bestimmt.

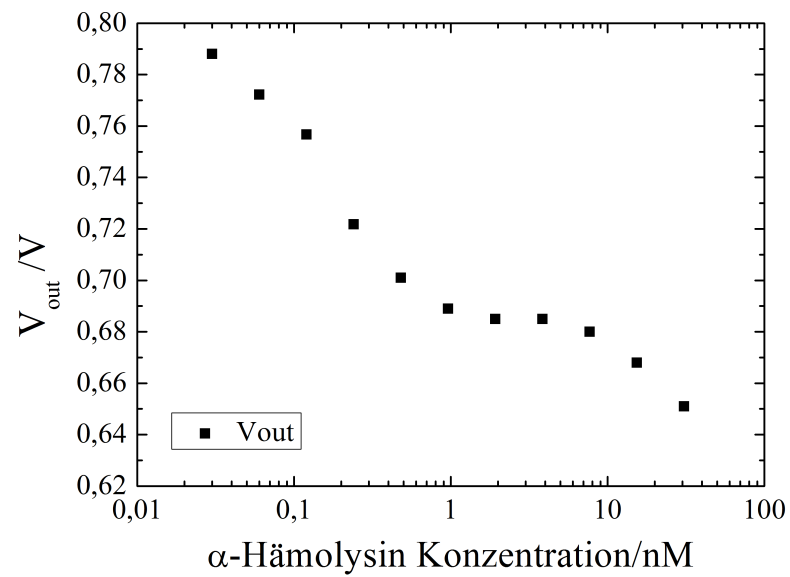


Abbildung 4.17: Simulierte Ausgangsspannung der Ausleseschaltung des Sensors in Abhängigkeit der α -Hämolysin-Konzentration

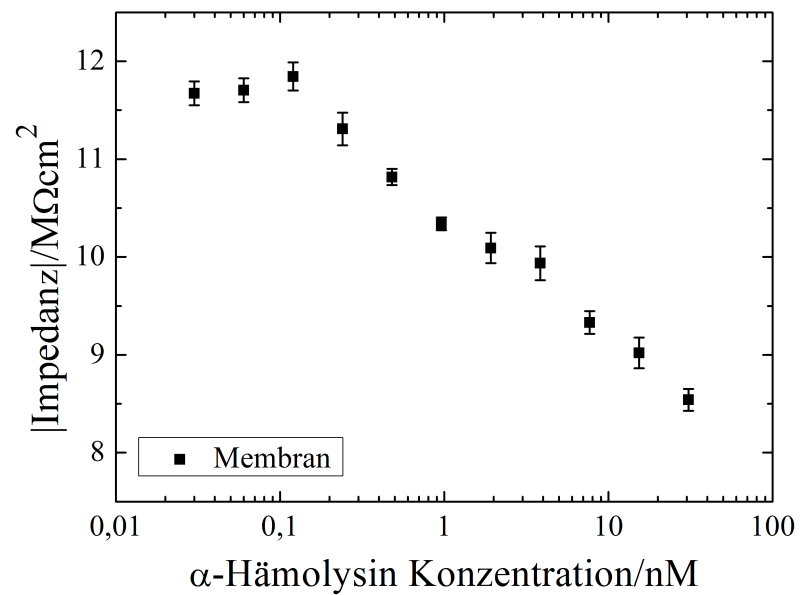


Abbildung 4.18: Widerstand der Doppellipidschicht in Abhängigkeit der α -Hämolysin-Konzentration

Die EIS-Messungen zur Bestimmung der Parameter R_M , C_M , R_E und C_S , welche für die Durchführung einer Simulation erforderlich sind, wurden an einer DPTL-Membran durchgeführt. Abbildung 4.16 zeigt die aus der Anpassung erhaltenen Werte der spezifischen Membran-Kapazität ξ_M und der spezifischen Spacer-Kapazität ξ_S in Abhängigkeit der α -Hämolysin-Konzentration. Hierbei ist ein Anstieg der spezifischen Spacer-Kapazität ξ_S mit zunehmender α -Hämolysin-Konzentration zu erkennen, während die spezifische Membran-Kapazität ξ_M , wie erwartet, nahezu konstant bleibt. ξ_S steigt bei einer Erhöhung der α -Hämolysin-Konzentration (von 0,03 nM auf 39 nM) von $5,8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ auf $9,4 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ an.

Auffällig ist das Plateau der Spacer-Kapazitätskurve im Bereich von 1 nM bis 10 nM. Wie schon erwähnt, ist bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ionophoren, von erheblicher Bedeutung wie lange jeweils die Membran den Ionophoren ausgesetzt ist, da die Sorption nicht reversibel ist. Daher müssen die Zeitabstände zwischen zwei Messungen unterschiedlicher Konzentrationen immer gleich sein. Zusätzlich variiert der Abstand der Pipettenspitze zur Doppellipidschicht bei jeder Präparation und damit die Zeit, die die Ionophore benötigen, um die Doppellipidschicht zu erreichen. Dadurch entstehen Schwankungen in den Messergebnissen. Durch eine automatisierte, maschinelle Zugabe der Ionophore könnte das Problem gelöst werden.

Abbildung 4.17 zeigt die resultierende simulierte Ausgangsspannung V_{out} in Abhängigkeit der α -Hämolysin-Konzentration, wobei für die Simulation die aus den EIS-Messungen bestimmten Werte für R_M , C_M , R_E und C_S eingesetzt wurden.

Das Plateau aus der Spacerkapazitätskurve ist als Folge auch in Abbildung 4.17 zu erkennen.

Die kleinste nachgewiesene Konzentration ist in diesem Experiment 30 pM [66]. Die Ausleseschaltung zeigt hier eine ausreichende Empfindlichkeit, um für viele Anwendungen in der biochemischen Analyse eingesetzt werden zu können.

4.2.2.2 Modifikation der Ausleseschaltung

Mit den Ergebnissen aus der Simulation wurde schließlich die Ausleseschaltung entwickelt und der CMOS-Chip gefertigt. Die Kapazitäten in der Rückkopplungsschleife des CMOS-Chips wurden für Membranen mit Kapazitäten im Bereich von 100 - 400 pF konzipiert. Für die Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass die Kapazitäten C_M und C_S mit der Elektrodenfläche skalieren [48]. Die spezifische Kapazität ξ_M der am MPIP in Mainz hergestellten tBLMs liegt im Bereich von 0,5 - 1,1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [63][61][68][23]. Der Kapazitätsbereich wird daher für Elektroden mit einer Größe von $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ erwartet. Nach der Chipfertigung wurde mittels EIS die Gesamtkapazität C_{ges} im PDMS-Fenster zu 5,30 nF bestimmt (vgl. Abschnitt 4.2.2.5). Dies ist um eine Größenordnung größer als die erwartete Kapazität. Ursache für die erhöhte Kapazität ist wohlmöglich die Isolierung der Membran am Rand. In diesem Fall skaliert bei kleiner werdenden Elektroden die Kapazität zunehmend nicht mehr mit der Elektrodenfläche, sondern mit dem Elektrodenumfang [23], da durch eine schlechtere Isolierung am Rand Ionen zur Elektrodenoberfläche gelangen können. Daraus folgt, dass die Elektrodenfläche kleiner werden muss. Um Kapazitäten im gewünschten Bereich zu erreichen, müsste die Elektrodengröße $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ betragen. Dies bedeutet für die Elektrodenherstellung einen erheblichen Mehraufwand. Der Chip stellt zwar die Möglichkeit bereit mit Hilfe einer Offset-Spannung den Messbereich zu verschieben, allerdings ist diese auf 5,5 V begrenzt. Der einstellbare Bereich (vgl. Abschnitt 4.2.2.3) ist für die in dieser Arbeit verwendeten Elektroden so nicht ausreichend.

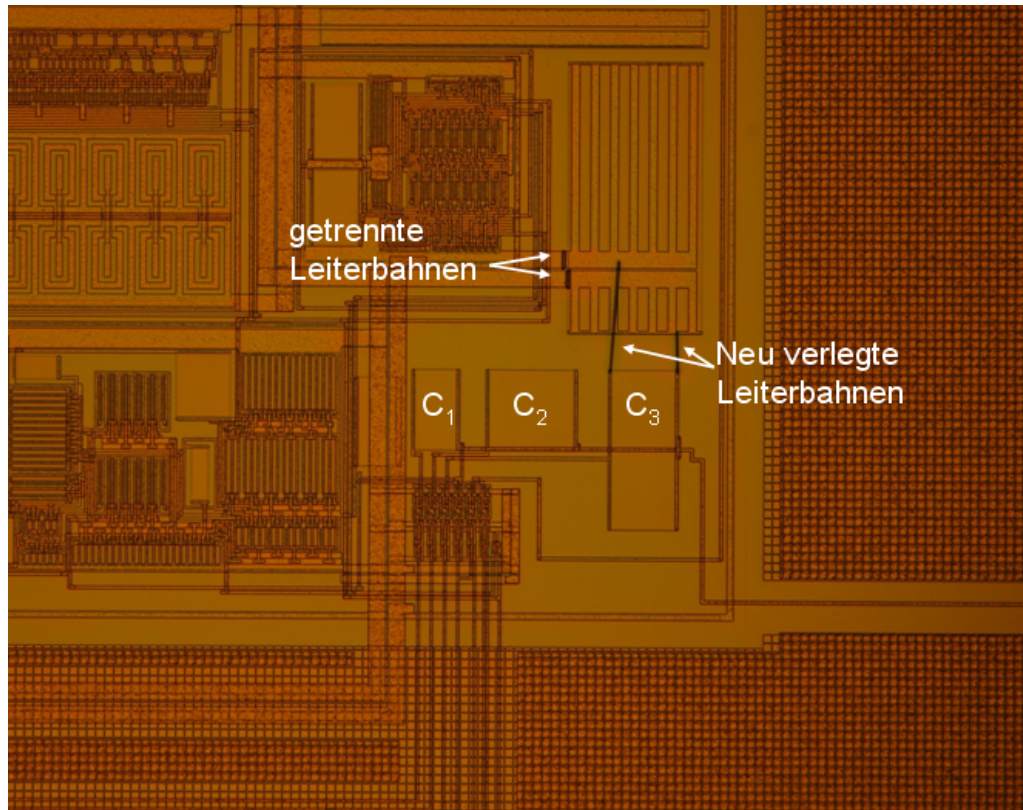


Abbildung 4.19: FIB-modifizierter Bereich des Sensorchips. C1, C2 und C3 sind die Kapazitäten der Rückkopplungsschleife. Die modifizierten Leiterbahnen sind mit Pfeilen markiert.

Es wurde daher auf dem Chip nach einer Möglichkeit gesucht, die Kapazitäten in der Rückkopplungsschleife zu vergrößern um somit den Chip an die Elektrodengröße anzupassen. Es steht eine 100 pF-Kapazität zur Verfügung, die in der Nähe der Kapazitäten der Rückkopplungsschleife liegt. Die bisherige Aufgabe der Kapazität war ein Teil der Pufferung der Betriebsspannung V_{DD} des Chips, die jedoch durch die Entfernung dieser Kapazität (laut Simulation mit dem Programm Cadence) nicht gefährdet ist. Die Integration der 100 pF-Kapazität in die Rückkopplungsschleife wurde mit einer Ionenfeinstrahlanlage (FIB¹) vom Fraunhofer IWM in Halle realisiert. Die Leiterbahnen zur Betriebsspannung wurden abgeschnitten und es wurden

¹englisch: focused ion beam

zwei neue Leiterbahnen verlegt, um die so erhaltene Kapazität mit einer Kapazität in der Rückkopplungsschleife parallel zu schalten.

Eine mikroskopische Aufnahme der Kapazitäten in der Rückkopplungsschleife und der FIB-modifizierten Bereiche ist in Abbildung 4.19 zu sehen.

4.2.2.3 Test der Ausleseschaltung

Nach der Modifikation der Ausleseschaltung wird die ordnungsgemäße Funktion des CMOS-Chips getestet. Hierfür wird das Ersatzschaltbild der Membran wieder mit diskreten Bauelementen auf einer Platine aufgebaut. Als Elektrolytwiderstand R_E wird ein 1 k Ω -Widerstand eingesetzt. Der verwendete Kondensator $C_M=2,43$ nF besitzt einen parasitären Widerstand von 17 M Ω . Es wird daher kein weiterer Widerstand als Membranwiderstand R_M eingesetzt. Die Kapazität des Spacers und der Doppellipidschicht wird durch Kondensatoren im Bereich von 4,5 nF bis 8,9 nF in 220 pF Schritten nachgebildet. Die angelegte Spannung über der Membran wurde zu $0,235 \text{ V} \pm 0,001 \text{ V}$ bestimmt. Die Offsetspannung V_{OS} wird auf 5,5 V gesetzt.

Bei der Simulation der Schaltung ist zu beachten, dass die Werte für die Kapazitäten des CMOS-Chips, und somit auch die Kapazitäten der Kondensatoren in der Rückkopplungsschleife, fertigungsbedingt Abweichungen unterliegen. Der Sollwert der spezifischen Kapazität für das verwendete Oxid als Dielektrikum liegt für die Kapazitäten der Rückkopplungsschleife zwischen $1,96 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$ und $2,55 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$. Für die erste Simulation zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit der Sensorschaltung vor der Fertigung wurde der Mittelwert des Sollwertes $2,255 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$ für die Kapazitäten der Rückkopplungsschleife verwendet. Nach der Fertigung der CMOS-Chips, wird die Spezifikation der Schaltung durch Messungen an den Testbauelementen im Ritzrahmen überprüft. Bei diesen Messungen wurde festgestellt, dass der Wert der spezifischen Kapazität nur $1,78 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$ (Faktor 0,789) beträgt. Dies spricht dafür, dass die aufgetragenen Oxide abweichende Schichtdicken besitzen. Hierdurch ergeben sich dann abweichende Kapazitätswerte und damit eine Abweichung der Ausgangsspannung der Schaltung. Für C_1 , C_2 und C_3 ergeben sich hiermit statt

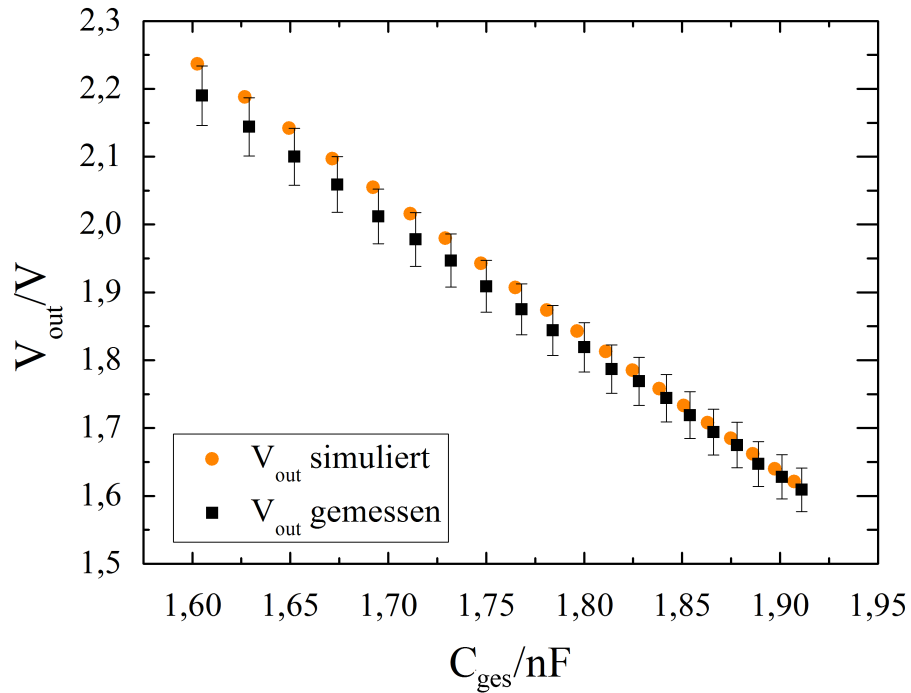


Abbildung 4.20: Test des modifizierten Chips mit diskreten Bauelementen. Die Graphen zeigen die Messung im Vergleich zur Simulation

10 pF, 20 pF und 30 pF nur 7,89 pF, 15,78 pF und 23,67 pF. Diese Werte wurden nachträglich in die Simulation mit einbezogen. Mit der gemessenen spezifischen Kapazität ergibt sich für C_i nun statt 150 pF ein Wert von 121,2 pF.

Abbildung 4.20 zeigt die gemessene und die simulierte Ausgangsspannung V_{out} in Abhängigkeit der Gesamtkapazität C_{ges} . Messung und Simulation stimmen im Rahmen der Messungenauigkeit überein. Damit ist die ordnungsgemäße Funktion des Chips nachgewiesen.

Die Kennlinie der Ausgangsspannung V_{out} in Abhängigkeit der Gesamtkapazität C_{ges} ist für $V_{OS}=5,5$ V durch

$$V_{out} = -1,89 \frac{V}{C} \cdot C_{ges} + 5,22 V \quad (4.1)$$

gegeben. 5,5 V ist die höchste einstellbare Offsetspannung. Bei Spannungen oberhalb von 5,5 V sorgen interne Schutzdiodenschaltungen des CMOS-Chips für einen Spannungsabfall. Damit ergibt sich eine obere Grenze für die messbare Kapazität

von 2,50 nF.

Durch das Auf- und Entladen von C_{ges} mit einer Frequenz von 1 kHz wird ein

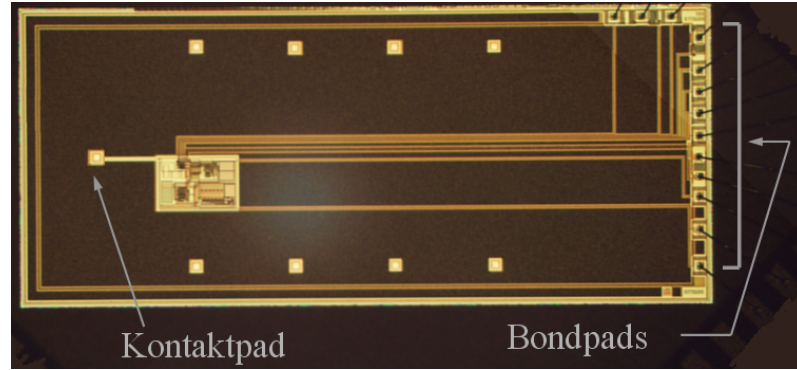


Abbildung 4.21: Sensorchip (9,4 mm x 5 mm) mit Ausleseschaltung und Kontaktpad für die Elektrode

Echtzeit-nahes Ergebnis erhalten. Es können damit im Millisekundenbereich veränderliche Prozesse beobachtet werden.

Der fertige Sensorchip mit einer Fläche von ist in Abbildung 4.21 dargestellt.

4.2.2.4 Charakterisierung der Membran

	$R_M/\text{M}\Omega$	C_M/nF	C_{Spacer}/nF
Monolayer	$15,32 \pm 2,60$	$8,91 \pm 0,52$	$19,743 \pm 1,18$
Bilayer	$30,69 \pm 5,56$	$7,44 \pm 0,46$	$18,41 \pm 1,42$
Valinomycin	$19,54 \pm 3,50$	$7,44 \pm 0,48$	$24,48 \pm 1,94$

Tabelle 4.6: Aus der Anpassung bestimmte Werte für R_M , C_M , C_{Spacer} und R_{Spacer} der Monolage, der Doppellipidschicht und der Doppellipidschicht mit Valinomycin der Konzentration 100 nM in der Messzelle

Abbildung 4.22 zeigt die Impedanzspektren der Monolage, der Doppellipidschicht und der Doppellipidschicht mit 100 nM Valinomycin in der Messzelle. In Tabelle 4.6 sind die spezifischen Widerstände und Kapazitäten zusammengefasst. Die Anpassungskurve an die Messdaten wurde dabei mit dem Ersatzschaltbild in Abbildung

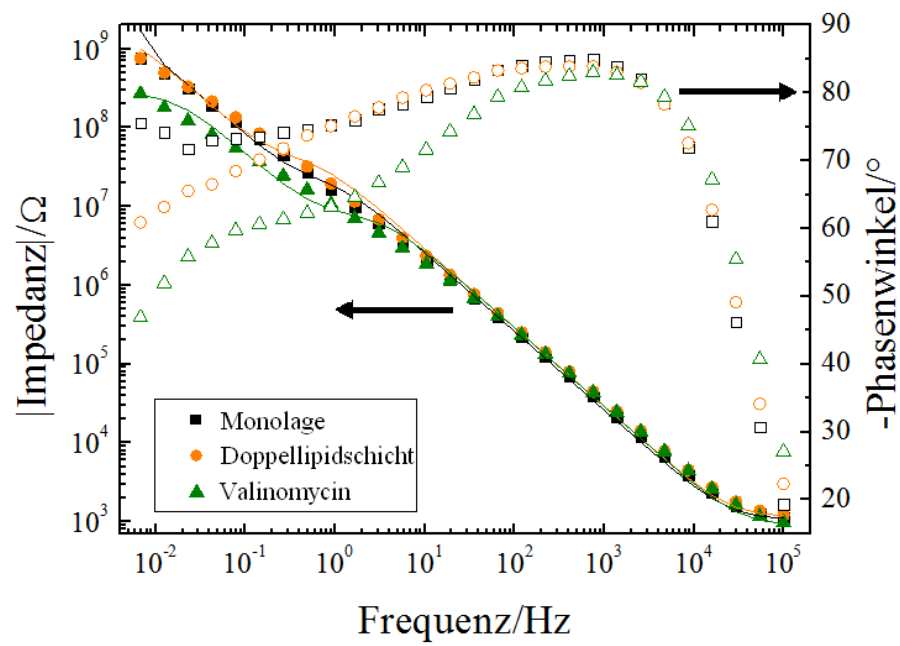


Abbildung 4.22: Impedanzspektren der Membran. Quadrate: Impedanzspektrum der Monolage. Kreise: Impedanzspektrum der Doppellipidschicht. Dreiecke: Mit 100 nM Valinomycin.

4.23 ermittelt. Bei der Bildung der Doppellipidschicht durch die Vesikelfusion erhöht sich die Schichtdicke der Membran, wodurch sich die Membrankapazität C_M verringert und der Membranwiderstand R_M ansteigt. Beim Einbau des Valinomycins bleibt die Membrankapazität konstant und der Membranwiderstand verringert sich durch die erhöhte Ionenleitfähigkeit. Durch den Anstieg der Ionenkonzentration in der Spacerregion ist eine Erhöhung der Spacerkapazität zu beobachten.

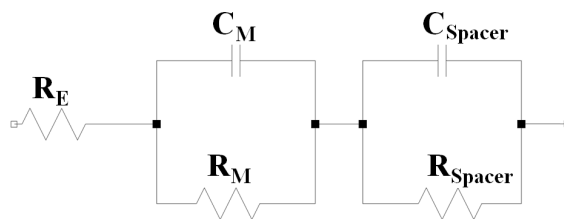


Abbildung 4.23: Ersatzschaltbild zur Anpassung an die Messdaten

4.2.2.5 Ankopplung an die Sensorschaltung

Für eine Berechnung der Ausgangsspannung $V_{out,berechnet}$ zum Vergleich mit $V_{out,gemessen}$, dem Ergebnis der Messung mit der Sensorschaltung, wird die Gesamtkapazität C_{ges} der Membran berechnet. Mit Hilfe der in 4.2.2.3 bestimmten Kennlinie der Ausleseschaltung kann so die erwartete Ausgangsspannung $V_{out,berechnet}$ berechnet werden. Für die Doppellipidschicht ergibt sich eine Gesamtkapazität von 5,30 nF. Dies liegt oberhalb des messbaren Bereiches der Schaltung von 2,50 nF, jedoch zumindest in der gleichen Größenordnung. Um die Gesamtkapazität zu verringern und damit an die Ausleseschaltung anzupassen, wird zwischen Membran und Ausleseschaltung eine zusätzliche Kapazität $C_E = 2,18$ nF in Reihe geschaltet (vgl. Abbildung 4.24). Mit der seriellen Kapazität C_E ergibt sich die neue Gesamtkapazität $C_{ges,E} = \frac{C_{ges} \cdot C_E}{C_{ges} + C_E}$. Dabei ist zu beachten, dass sich dadurch jedoch der Absolutwert der Kapazitätsänderung bei Absorption des Valinomycins verringert. Dies hat zur Folge, dass die Sensitivität der Ausleseschaltung verringert wird. Die Messergebnisse und die Ergebnisse

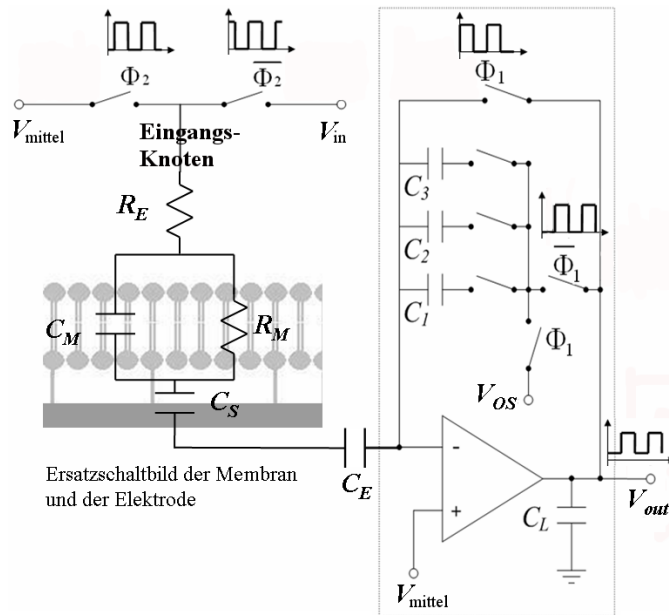


Abbildung 4.24: Für den Versuch wurde zur Verringerung der Gesamtkapazität eine zusätzliche Kapazität C_E in Reihe geschaltet

der Berechnungen sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Wie erwartet verringert sich die absolute Kapazitätsänderung durch Einsetzen von C_E und es kann ein messbares Ergebnis beobachtet werden. Die Kapazitätsänderung verursacht eine Spannungsänderung von $V_{out,gemessen}=2,35\text{ V}\pm 0,07\text{ V}$ auf $V_{out,gemessen}=2,24\text{ V}\pm 0,07\text{ V}$ am Ausgang der Ausleseschaltung. Die gemessenen und berechneten Werte für die Ausgangsspannung stimmen im Rahmen der Messungenauigkeit überein.

Wie auch bei der Durchführung des Experimentes zur Verifizierung des Messprin-

	Bilayer	100 nM Valinomycin
$C_{ges} = \frac{C_M \cdot C_S}{C_M + C_S} / \text{nF}$	$5,30 \pm 0,47$	$5,71 \pm 0,83$
$C_{ges,E} = \frac{C_{ges} \cdot C_E}{C_{ges} + C_E} / \text{nF}$	$1,54 \pm 0,08$	$1,58 \pm 0,12$
$V_{out,gemessen} / \text{V}$	$2,35 \pm 0,07$	$2,24 \pm 0,07$
$V_{out,berechnet} / \text{V}$	$2,31 \pm 0,07$	$2,23 \pm 0,07$

Tabelle 4.7: Messergebnisse und Ergebnisse der Berechnungen

zips mit der diskreten Schaltung traten auch hier anfangs Probleme beim Einbau

des Valinomycins in die Membran auf. Das Denaturieren des Valinomycins konnte schließlich durch Erwärmen vor der Zugabe zur Messlösung behoben werden. Das Valinomycin wird bei -18°C gelagert. Bei diesen Temperaturen besitzt es eine leicht andere Konformation im Lösungsmittel. Beim Erwärmen steigt die Löslichkeit im Ethanol und diese wird dann beim Zugeben in die Messlösung beibehalten [24].

4.3 Die Valinomycinkonzentration in der Doppellipidschicht

In den vorherigen Abschnitten wurden bisher nur Aussagen über die Valinomycinkonzentration der Lösung der Messzelle gemacht. Dies hat folgenden Grund: Die Valinomycinkonzentration der Lösung ist relativ einfach zu beeinflussen, da das Volumen der Messzelle bekannt ist und eine bestimmte Menge Valinomycinlösung bekannter Konzentration der Messlösung hinzugegeben werden kann. Die Konzentration an Valinomycin in der Membran ist hingegen nicht einfach zu bestimmen. Der Diffusionskoeffizient des Valinomycins in der Lösung und in der Membran, die Messzellegeometrie und die Präparation mit einer Pipette sind Parameter, die sich nur schwer bestimmen bzw. kontrollieren lassen.

Da aber für einen Biosensor die Stoffmenge, die detektiert wird, interessant ist, wird im Folgenden ein anderer Ansatz gewählt. Die Anzahl der Peptide in der Membran werden anhand der gemessenen Widerstandsänderungen bestimmt. Hierfür werden die Ergebnisse der DPTL-Membran aus 4.2.1.1 verwendet, da so ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der diskreten Schaltung und der CMOS-Schaltung (hier wurde eine DPTL-Membran verwendet) möglich ist.

Grundlage für die Berechnung sind die Überlegungen aus Abschnitt 2.3. Zuerst wird eine Kalibrationskurve erstellt, die die Valinomycinkonzentration der Messlösung mit der Anzahl der Valinomycinpeptide in der Membran korreliert. Im Anschluss werden die Werte mit den Kapazitätsänderungen korreliert und mit den Ergebnissen der DPTL-Membran der CMOS-Schaltung verglichen.

Tabelle 4.8 zeigt die Ergebnisse zur Berechnung der Anzahl der Peptide in der Membran für die jeweilige Valinomycinkonzentration der Messlösung. Ausgangspunkt hierfür ist die Transportrate der Peptide. Pro Peptid werden 10000 Ionen pro Sekunde transportiert ($I_p = 10000/s$) [29]. Da die Ionen einfach positiv geladen sind ($z \cdot e = e$, e Elektronenladung z Ladungszahl der Ionen), ergibt sich

$$I_I = I_p \cdot v \cdot e = 1,602 \text{ pA}. \quad (4.2)$$

Der Ionenstrom I_I eines Peptids ist proportional zur Differenz der gemessenen Stromdichte der Doppellipidschicht J_M und der Doppellipidschicht mit Valinomycin J_V . Die Anzahl der Peptide N_V pro cm^2 in der Doppellipidschicht kann daher über

$$N_V = \frac{(J_M - J_V)}{I_I} \quad (4.3)$$

berechnet werden. Die angelegte Spannung über der gesamten Membran in dem Experiment beträgt $V=0,01 \text{ V}$. Damit ergeben sich die in Tabelle 4.8 berechneten Werte. Dies bedeutet für die 10 nM Konzentration im Durchschnitt 53 Peptide auf

Valinomycin-Konzentration	$\rho_M/\text{k}\Omega\text{cm}^2$	J_M bzw. $J_V/\mu\text{A}/\text{cm}^2$	$J_M - J_V/\mu\text{A}/\text{cm}^2$	$N_V/10^3 \cdot \text{cm}^{-2}$
Bilayer	$26 \pm 1,6$	$0,38 \pm 0,02$	0	0
10 nM	$8,1 \pm 0,6$	$1,23 \pm 0,09$	$0,85 \pm 0,09$	$530,56 \pm 0,02$
20 nM	$3,2 \pm 0,3$	$3,13 \pm 0,29$	$2,74 \pm 0,29$	$1710,60 \pm 0,02$
30 nM	$2,8 \pm 0,2$	$3,57 \pm 0,26$	$3,19 \pm 0,26$	$1989,27 \pm 0,02$

Tabelle 4.8: Berechnung der Anzahl der Valinomycin-Peptide bei verschiedenen Valinomycin-Konzentrationen der Messlösung

einer Fläche von $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$. Jedes Peptid hat einen Durchmesser lateral in der Membran von $6-8\text{\AA}$ [69].

Abbildung 4.26 korreliert die Anzahl der in der Doppellipidschicht integrierten Valinomycinpeptide N_V mit der Kapazität $\Delta C_S = C_{S,\text{Doppellipidschicht}} - C_{S,\text{Valinomycin}}$. Die Berechnung zeigt einen eindeutigen Trend. Mit zunehmender Spacerkapazität steigt

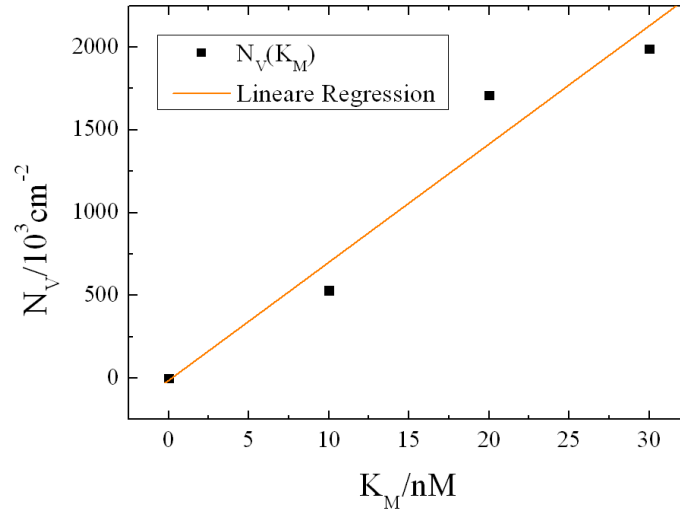


Abbildung 4.25: Der Zusammenhang zwischen der Valinomycinkonzentration der Messzelle und der Anzahl der Valinomycinpeptide in der DPTL-Membran wird über die Änderung des Membranwiderstandes berechnet.

die Anzahl der Peptide in der Membran. Eine lineare Regression ergibt den Zusammenhang

$$N_V(C_S) = 2644,7 \cdot 10^3 \frac{1}{C} * \Delta C_S. \quad (4.4)$$

Abbildung 4.25 korreliert die Anzahl der in der Doppellipidschicht integrierten Valinomycin-Peptide N_V mit der Valinomycinkonzentration K_L der Lösung in der Messzelle. Die Berechnung zeigt auch hier einen eindeutigen Trend. Mit zunehmender K_L nimmt die Anzahl der Peptide in der Membran zu. Eine lineare Regression ergibt den Zusammenhang

$$N_V(K_M) = 70,85 \cdot 10^3 \frac{1}{\text{nM}} * K_L. \quad (4.5)$$

Dabei ist zu beachten, dass nur für den gemessenen Bereich ein linearer Zusammenhang besteht. Vermutlich tritt ab einer bestimmten Anzahl von Peptiden ein Sättigungseffekt auf, der dadurch verursacht wird, dass die Peptide eine räumliche Ausdehnung haben und ab einer gewissen Valinomycin-Konzentration die vorhandenen Peptide einen Einbau weiterer Peptide verhindern.

Die direkte Übertragung auf das CMOS-System ist nicht ohne weiteres möglich,

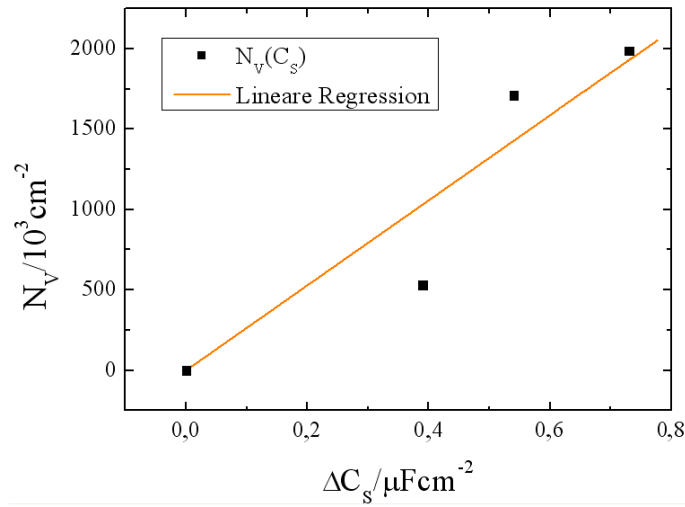


Abbildung 4.26: Zusammenhang zwischen der in Tabelle 4.8 berechneten Anzahl der Valinomycinpeptide in der DPTL-Membran und der Kapazität C_S der DPTL-Membran aus Abschnitt 4.2.1.1

da die Ergebnisse mit unterschiedlichen Ersatzschaltbildern berechnet werden. Im Fall der diskreten Schaltung ist der Widerstand R_{Spacer} so groß, dass die Kapazitäten der starren Helmholtz-Schicht C_H und des Spacers C_{Spacer} zu einer Kapazität C_S zusammengezogen werden. Bei der Messung der Membran der CMOS-Schaltung sind R_{Spacer} und C_{Spacer} im Impedanzspektrum erkennbar, C_H jedoch nicht. Da die Gesamtkapazität zweier seriell geschalteter Kapazitäten kleiner ist, als die Kapazität der einzelnen, ist C_{Spacer} größer als C_S . Bei Anwenden der Regressionskurve der Gleichung 4.4 auf die Kapazität C_{Spacer} ergibt sich eine Anzahl von $N_V(C_S)=160,53 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-2}$ (die Kapazitätsänderung $\Delta\xi_{Spacer}$ beträgt $60,7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$). Dieser Wert ist um einen Faktor 1000 größer als der erwartete Wert. Daher muss für die CMOS-Schaltung eine neue Kalibrationskurve erstellt werden. Wird die Regressionskurve der Gleichung 4.5 auf die hinzugefügte Valinomycinkonzentration von 100 nM angewandt, ergibt sich ein $N_{V,CMOS}(K_M)=7085 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}$. Wird die Anzahl der Peptide in der Membran der CMOS-Schaltung wie oben für die diskrete Schaltung mit der Widerstandsänderung $\Delta\rho_M=1,12 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ berechnet, ergibt sich ein Wert von $N_V)=5599 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}$. Unter Berücksichtigung der Verwendung von

unterschiedlichen Messaufbauten (s.o.) ist dies durchaus ein akzeptabler Wert im Vergleich zu der aus 4.5 bestimmten Anzahl der Peptide. Daher können die oben gemachten Annahmen bestätigt werden und es wird erwartet, dass Kapazitätsänderungen mit der CMOS-Schaltung gemessen werden können.

Um die Auflösung der Schaltung zu bestimmen, wird die Gesamtkapazitätsänderung $\Delta C_{ges,E}=0,04\text{ nFcm}^{-2}$ mit der Anzahl der Peptide in der Membran verknüpft. So ergibt sich $\frac{N_V(C_{Spacer})}{\Delta \xi_{Spacer}} = \frac{5599 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-2}}{40 \text{ pFcm}^{-2}} = 140 \cdot 10^3 / \mu\text{F}$. Die derzeitige Auflösung des Messaufbaus mit der CMOS-Schaltung und dem Oszilloskop liegt bei 0,07 V. Dies entspricht einer Kapazitätsänderung von 0,04 nF und damit gerade der hier berechneten Anzahl der Peptide. Der limitierende Faktor hierbei ist die Messung mit dem Oszilloskop. Eine Möglichkeit, die Auflösung zu verbessern, ist der Einbau einer Sample-and-Hold-Stufe und das Auslesen mit einem Multimeter. Bei einer Auflösung von 5 mV, was einer Kapazität von 2,65 nF entspricht, ergibt sich für die Schaltung eine Nachweisgrenze von 371 Peptiden in der Membran. Dies entspricht einer Valinomycinkonzentration in der Lösung von etwa 10 pM. Auch wenn bei den Berechnungen nur zwei Datenpunkte berücksichtigt werden konnten, so gibt die Berechnung eine grobe Abschätzung, in welchem Bereich sich die Auflösung befindet.

5. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird ein bislang nicht erprobte kapazitive Sensorprinzip erfolgreich verifiziert. Die Verifizierung wird in zwei Schritten nachgewiesen.

Im ersten Schritt wird anhand einer diskreten Schaltung die Eignung der Spacerkapazität als Auslesesignal gezeigt. Es kann zunächst mit einer diskreten Ausleseschaltung gezeigt werden, dass die Spacerkapazität eine geeignete Messgröße für die Valinomycinkonzentration ist. Die kleinste nachgewiesene Valinomycinkonzentration beträgt in diesem Experiment 10 nM. Weiterhin wird über die Membranwiderstandsänderung ein Zusammenhang zwischen der Valinomycinkonzentration der Lösung und der Anzahl der Valinomycinpeptide in der Membran hergestellt.

Im zweiten Schritt wird eine CMOS-basierte "Switched-Capacitor-Schaltung" auf einem Sensorchip für die Auswertung der Spacerkapazitätsänderung verwendet. Mit einer Testschaltung aus diskreten Bauelementen, die die biomimetische Membran imitieren, wird die Funktion der Schaltung erfolgreich nachgewiesen: Die Abweichung der Messergebnisse von den Simulationsergebnissen liegt im Bereich der Messungenauigkeit. Mit der abschließenden Messung der Spacerkapazitätsänderung bei Änderung der Valinomycinkonzentration in der Messlösung ist das Biosensorprinzip erfolgreich verifiziert. Mit dem derzeitigen Messaufbau liegt die Nachweisgrenze bei 100 nM. Eine grobe Abschätzung der möglichen Sensitivität des Prinzips ergibt so-

gar eine Nachweisgrenze von etwa 10 pM. Damit sind alle Voraussetzungen erfüllt, das kapazitive Biosensorprinzip in kommerzielle Anwendungen zu transferieren.

Für eine kommerzielle Anwendung ist die Integration der Mikroelektroden auf dem CMOS-Chip unerlässlich. Im Fraunhofer IMS steht ein Mikrosystem-Technik-Labor zur Verfügung, in dem es möglich ist, CMOS-inkompatible Schichten, die für die Herstellung von Mikroelektroden für Biosensoren notwendig sind, z.B. Gold oder Platin, zu prozessieren. Die Integration der Mikroelektroden geschieht dabei in einem Post-CMOS-Prozess. Weiterhin wird durch eine automatisierte Präparation der biomimetischen Membranen, z.B. durch den Einsatz eines Nanodispensers, die Reproduzierbarkeit der Eigenschaften der Membran erhöht.

Kommerzielle Anwendungsmöglichkeiten bestehen, neben dem Einsatzgebiet zum Nachweis von Tumormarkern, in der Pharma-Industrie. Eine Reihe von Herzmedikamenten haben einen Einfluss auf die ligandengesteuerten Ionenkanäle im menschlichen Körper. Um diesen Einfluss zu untersuchen, könnten die Ionenkanäle in die biomimetische Membran eingebaut werden. Das neue Biosensorprinzip bietet durch den Betrieb im Kilohertz-Bereich die Möglichkeit, Signale in Echtzeit auszuwerten. Es können damit Prozesse beobachtet werden, die im Millisekundenbereich ablaufen. Weiterhin wird vom IMS nach Kooperationspartnern für den Bereich der Modifizierung der ligandengesteuerten Ionenkanäle gesucht, um das Know-How im Bereich der ligandengesteuerten Ionenkanäle zu erweitern. Diese Modifizierung ermöglicht eine Erhöhung der Spezifität der Ionenkanäle und die Anpassung des Systems an verschiedene Analyten.

Für die Steigerung der Sensitivität der Schaltung ist es weiterhin erforderlich, weitere Membranmaterialien zu untersuchen, da z.B. die Länge und Dichte des Spacers einen Einfluss auf die Größe der Signaländerung haben. Weiterhin wäre es interessant, Membranen mit einer größeren Spannungsfestigkeit zu untersuchen. Dadurch könnte die angelegte Spannung über der Membran vergrößert werden und damit auch die Sensitivität der Schaltung.

Derzeit wird vom IMS ein Projekt beantragt, bei dem das in der vorliegenden Ar-

beit entwickelte Biosensorprinzip für die Entwicklung einer künstlichen Nase erprobt werden soll.

Die vorstehende Sammlung von Anwendungsmöglichkeiten zeigt, wie wertvoll das in der vorliegenden Arbeit verifizierte Sensorprinzip für die Entwicklung kommerzieller Produkte, zum Beispiel in der Medizin, sein kann.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Bereich der Biosensorik zum Nachweis von Tumormarkern.

Die herkömmlichen Methoden, um Krebs beim Menschen zu diagnostizieren, sind bildgebende Verfahren. Da mit diesen Verfahren lediglich vergleichsweise große Tumoren sicher bestimmt werden können, ist es wünschenswert, Verfahren zu entwickeln, die in der Lage sind, Krebs in einem früheren Entwicklungsstadium zu erkennen. Dies ist durch den Nachweis der sogenannten Tumormarker in Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Blut, Urin und Speichel möglich. Da die vorhandenen Laboranalysen sehr aufwändig sind, werden neue Nachweisverfahren gesucht, die eine kostengünstige, schnelle und leicht handhabbare Alternative bieten.

Hierfür gibt es vielfältige Ansätze. Es gibt massensensitive, thermische, optische, magnetische, elektrochemische und kapazitive Verfahren.

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Biosensorprinzip basiert auf der Auswertung eines kapazitiven Effektes. Der Sensor besteht aus einer Ausleseschaltung und einer Elektrode mit einer darauf angebundenen biomimetischen Membran, welche die Fähigkeit besitzt, Valinomycinpeptide zu absorbieren. Für die Detektion der Valinomycinpeptide wird das Phänomen ausgenutzt, dass sich die Kapazität der Region zwischen Membran und Elektrode, der sogenannten Spacerregion, bei

Absorption von Valinomycinpeptiden ändert. Dieser Effekt wurde bislang nicht für Biosensoranwendungen genutzt.

Um die Anwendung dieses Effektes in der Biosensorik zu prüfen, wird zunächst mit einer diskreten Ausleseschaltung der Nachweis erbracht, dass die Änderung der Spacerkapazität der Membran bei Veränderung der Valinomycinkonzentration messtechnisch umsetzbar ist.

Zur Realisierung einer Ausleseschaltung in CMOS wird eine "Switched-Capacitor-Schaltung" verwendet. Die Überprüfung der Funktion des Sensorchips nach der Fertigung mit einer Testschaltung, die die Membran imitiert, ergibt eine Übereinstimmung zwischen Simulation und Messung im Rahmen der Messungenauigkeit. Damit ist bestätigt, dass der Chip die Kapazitätsänderungen auslesen kann. Weiterhin wird mit der CMOS-Ausleseschaltung eine Valinomycinkonzentrationsänderung von 100 nM nachgewiesen. Eine grobe Abschätzung der Nachweisgrenze ergibt eine Valinomycinkonzentration von etwa 10 pM.

Das neueartige Biosensorprinzip ist markerfrei und ermöglicht eine quantitative Aussage über die Konzentration des Analyten in der Messlösung. Dies ist ein Vorteil gegenüber optischen Verfahren, wie z.B. der Fluoreszenzspektroskopie. Darüber hinaus ist das Messergebnis direkt ablesbar. Es muss nicht aus einer theoretischen Anpassung der Messdaten, wie z.B. bei der elektrochemischen Impedanzspektroskopie extrahiert werden. Schnelle Messungen werden über eine Ansteuerung des Chips im Kilohertz-Bereich erreicht. Zusätzlich ermöglicht das Messverfahren Messungen in Flüssigkeiten.

Um das Biosensorprinzip für den Nachweis von Tumormarkern einzusetzen, können künstlich modifizierte Ionenkanäle statt der Valinomycinpeptide in die biomimetische Membran integriert werden. Der Öffnungs- bzw. Schließmechanismus des Kanals wird dann durch den Tumormarker gesteuert.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wird der Bereich der Biosensorik um ein neuartiges Biosensorprinzip erweitert. Die Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten zeigt, wie wertvoll das in der vorliegenden Arbeit verifizierte Sensor-

prinzip für die Entwicklung kommerzieller Produkte, zum Beispiel in der Medizin, sein kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Perlmann P. Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8:871, 1971.
- [2] International Organization for Standardization. Iso 22870: Point-of-care testing (poc) – requirements for quality and competence, 2006.
- [3] M.C. Tran. *Biosensors*, volume 1. Springer, 1993.
- [4] M. Zourob, S. Elwary, and A. Khademhosseini. *Recognition receptors in biosensors*. Springer Verlag, 2010.
- [5] M.H. Gey. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [6] Rolf D. Schmid and Ursula Bilitewski. Biosensoren. *Chemie in unserer Zeit*, 26(4):163–174, 1992.
- [7] R.D. Schmid and U. Bilitewski. Biosensoren. *Chemie in unserer Zeit*, 26(4):163–174, 1992.
- [8] Hermann J. Roth, Christa E. Müller, and Gerd Folkers. *Stereochemie und Arzneistoffe. Grundlagen - Betrachtungen - Auswirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsges., 7 1998.
- [9] B.R. Eggins. *Chemical sensors and biosensors*, volume 2. Wiley, 2002.

-
- [10] HL Schmidt and R. Kittsteiner-Eberle. Biosensoren. *Naturwissenschaften*, 73(6):314–321, 1986.
- [11] I. Willner and E. Katz. *Bioelectronics: from theory to applications*. Vch Verlagsgesellschaft MbH, 2005.
- [12] K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, and B. Winter. Chemo-und biosensoren-grundlagen und anwendungen. *Angewandte Chemie*, 103(5):519–541, 1991.
- [13] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Voeroes, and E. Reimhult. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3):1400–1458, 2008.
- [14] R.J. McNichols and G.L. Cote. Optical glucose sensing in biological fluids: an overview. *Journal of Biomedical Optics*, 5:5, 2000.
- [15] A.A. Karyakin, O.V. Gitelmacher, and E.E. Karyakina. Prussian blue-based first-generation biosensor. a sensitive amperometric electrode for glucose. *Analytical Chemistry*, 67(14):2419–2423, 1995.
- [16] D. Tümmers. *Das Erste Kompendium Vorklinik-Gk1*. Springer Verlag, 2007.
- [17] inc. AvantiPolarLipids. Produktinformation: 4me 16:0 diether pc, 2011.
- [18] C. Tanford. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, 200(4345):1012, 1978.
- [19] K.J. Euler. Elektrochemie i. leitfähigkeit, potentiale, phasengrenzen. taschentext 41. von ch hamann und w. vielstich. verlag chemie gmbh, weinheim 1975. 1. aufl., x, 192 s., 58 abb., 18 tab., geb. dm 26, 80. *Chemie in unserer Zeit*, 10(1):30–30, 1976.
- [20] P. Mueller, D.O. Rudin, H. Ti Tien, and W.C. Wescott. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*, 194:979–980, 1962.

-
- [21] K.B. Blodgett. Monomolecular films of fatty acids on glass. *Journal of the American Chemical Society*, 56(2):495–495, 1934.
- [22] Ingo Köper. Insulating tethered bilayer lipid membranes to study membrane proteins. *Mol. BioSyst.*, 3:651–657, 2007.
- [23] I. K. Vockenroth, C. Ohm, J. W. F. Robertson, D. J. McGillivray, M. Lösche, and I. Köper. Stable insulating tethered bilayer lipid membranes. *Biointerphases*, 3:FA68, 2008.
- [24] I. K. Vockenroth, P. P. Atanasova, J. R. Long, A. T. A. Jenkins, W. Knoll, and I. Köper. Functional incorporation of the pore forming segment of achr m2 into tethered bilayer lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(5):1114 – 1120, 2007.
- [25] Inga Vockenroth. *Investigations of tethered bilayer lipid membranes for their potential use in biosensing devices*. PhD thesis, University of Bath, Department of Chemistry, 2007.
- [26] B. Sakmann and E. Neher. *Single-channel recording*. Springer Verlag, 2009.
- [27] ChemicalBook. Valinomycin, 2009.
- [28] E. Gouaux. [alpha]-hemolysin from staphylococcus aureus: An archetype of [beta]-barrel, channel-forming toxins* 1. *Journal of structural biology*, 121(2):110–122, 1998.
- [29] D.E. Metzler and C.M. Metzler. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, volume 2. Academic Pr, 2003.
- [30] H.T. Tien and A. Ottova. *Membrane electrochemistry*. Wiley Online Library, 2007.
- [31] Mark E. Orazem and Bernard Tribollet. *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., 2008.

-
- [32] S. Krause. *Impedance methods*. Wiley Online Library, 2007.
- [33] Gamry Instruments. Sub-harmonic sampling for electrochemical impedance spectroscopy. webpage, October 22 2010.
- [34] E. Barsoukov and J.R. Macdonald. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*. LibreDigital, 2005.
- [35] W. Vielstich C. H. Hamann. *Elektrochemie I*. Hamann, Carl, 1985.
- [36] Hugo Fricke. The electric conductivity and capacity of disperse systems. *Physics*, 1(2):106–115, aug 1931.
- [37] R. De Levie. Transport of ions of one kind through thin membranes v. admittance for transport by membrane-confined carriers. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 58(1):203–216, 1975.
- [38] C. Steinem, A. Janshoff, K. von dem Bruch, et al. Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(1):17–26, 1998.
- [39] G. Krishna, J. Schulte, A. Bruce, R. Pace, L. Wieczorek, and P.D. Osman. Tethered bilayer membranes containing ionic reservoirs: the interfacial capacitance. *Langmuir*, 17(16):4858–4866, 2001.
- [40] Irving Langmuir. *Surface Chemistry*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966, 1932.
- [41] P.W. Atkins and R. Ludwig. *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 2001.
- [42] M. Tanaka and E. Sackmann. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *NATURE-LONDON-*, 7059:656, 2005.
- [43] Vladimir Atanasov, Petia P. Atanasova, Inga K. Vockenroth, Nikolaus Knorr, and Ingo Köper. A molecular toolkit for highly insulating tethered bilayer lipid membranes on various substrates. *Bioconjugate Chemistry*, 17(3):631–637, 2006.

- [44] W. Knoll, F. Yu, T. Neumann, S. Schiller, and R. Naumann. Supramolecular functional interfacial architectures for biosensor applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5(23):5169–5175, 2003.
- [45] N. Picollet-D’ahan, F. Sauter, F. Ricoul, C. Pudda, F. Marcel, T. Sordel, F. Chatelain, and I. Chartier. Multi-patch: A chip-based ion-channel assay system for drug screening. In *MEMS, NANO and Smart Systems, 2003. Proceedings. International Conference on*, pages 251–254. IEEE, 2003.
- [46] L. Becucci, M. D’Amico, S. Daniele, M. Olivotto, A. Pozzi, and R. Guidelli. A metal-supported biomimetic micromembrane allowing the recording of single-channel activity and of impedance spectra of membrane proteins. *Bioelectrochemistry*, 78(2):176–180, 2010.
- [47] B. Hassler, R.M. Worden, A. Mason, P. Kim, N. Kohli, J.G. Zeikus, M. Laive-nieks, and R. Ofoli. Biomimetic interfaces for a multifunctional biosensor array microsystem. In *Sensors 2004, Proceedings of IEEE*, pages 991–994. IEEE, 2004.
- [48] Bruce A. Cornell. *Ion Channel Biosensors*, chapter 21, pages 1–14. John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [49] B.A. Cornell, VLB Braach-Maksvytis, LG King, PDJ Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, and RJ Pace. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387(6633):580–583, 1997.
- [50] BA Wallace. Gramicidin channels and pores. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 19(1):127–157, 1990.
- [51] G. Radau. Stereochemie & arzneistoffe-grundlagen-betrachtungen-auswirkungen von hj roth, ce m
üller und g. folkers, wissenschaftliche verlagsgesellschaft mbh stuttgart 1998,

- 324 seiten, 364 abbildungen, davon 40 in farbe und 27 tabellen, dm 128,-; isbn 3-8047-1485-4. *Pharmazie in unserer Zeit*, 27(5):246–246, 1998.
- [52] GS Popkirov and RN Schindler. A new impedance spectrometer for the investigation of electrochemical systems. *Review of scientific instruments*, 63(11):5366–5372, 1992.
- [53] C. Yang, D. Rairigh, and A. Mason. On-chip electrochemical impedance spectroscopy for biosensor arrays. In *Sensors, 2006. 5th IEEE Conference on*, pages 93–96. IEEE, 2006.
- [54] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *A century of Nature: twenty-one discoveries that changed science and the world*, 260:224, 2003.
- [55] P. Wolber. Patch-clamp-anordnung. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Patch-clamp.png>, 11 2008.
- [56] P. Weerakoon, E. Culurciello, K.G. Klemic, and F.J. Sigworth. An integrated patch-clamp potentiostat with electrode compensation. *Biomedical Circuits and Systems, IEEE Transactions on*, 3(2):117–125, 2009.
- [57] A.F. Coskun, T.W. Su, and A. Ozcan. Wide field-of-view lens-free fluorescent imaging on a chip. *Lab Chip*, 10(7):824–827, 2010.
- [58] J. Melendez, R. Carr, D.U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, and R. Woodbury. A commercial solution for surface plasmon sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 35(1-3):212–216, 1996.
- [59] Y. Temiz, F.K. Gurkaynak, S. Terrettaz, H. Vogel, G. De Micheli, Y. Leblebici, C. Guiducci, and L. Benini. Real-time high-sensitivity impedance measurement interface for tethered blm biosensor arrays. In *Sensors, 2008 IEEE*, pages 650–653. IEEE, 2008.

-
- [60] S.B. Park, D. Hammerschmidt, R. Kokozinski, F. Wieland, M. Andersch, L. Dath, W. Brockherde, and BJ Hosticka. Sigma-delta-modulator 3. ordnung mit gechoppten differenzpfad-sc-integratoren, 1998.
- [61] S.M. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, and W. Knoll. Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(2):208–211, 2003.
- [62] Mathieu Jung. *Patterning of Tethered Bilayer Lipid Membranes*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, 2008.
- [63] R. Naumann, S.M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K.B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübben, K. Vasilev, and W. Knoll. Tethered lipid bilayers on ultraflat gold surfaces. *Langmuir*, 19(13):5435–5443, 2003.
- [64] S. Lingler, I. Rubinstein, W. Knoll, and A. Offenhäusser. Fusion of small unilamellar lipid vesicles to alkanethiol and thiolipid self-assembled monolayers on gold. *Langmuir*, 13(26):7085–7091, 1997.
- [65] Mike Engelhardt. Ltspice iv, version 4.12g, 2011.
- [66] S. Dierk, H.K. Trieu, and I. Köper. Cmos based biosensor with integrated biomembrane. In *Ph. D. Research in Microelectronics and Electronics (PRIME), 2010 Conference on*, pages 1–3. IEEE, 2010.
- [67] HG Yaworski and R. Bukovnik. Silicone gel technology for power cable accessories. In *Transmission and Distribution Conference and Exposition, 2001 IEEE/PES*, volume 2, pages 837–842. IEEE, 2001.
- [68] Vockenroth I.K., P.P. Atanasova, A.T.A. Jenkins, and I. Köper. Incorporation of α -hemolysin in different tethered bilayer lipid membrane architectures. *Langmuir*, 24(2):496–502, 2008.

-
- [69] D.C. Tosteson, P. Cook, T. Andreoli, and M. Tieffenberg. The effect of valinomycin on potassium and sodium permeability of hk and lk sheep red cells. *The Journal of general physiology*, 50(11):2513–2525, 1967.